Der Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf die oxidative Phosphorylierung in isolierten Lebermitochondrien

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Volkmar Will

Saarbrücken

1972

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Abteilung für biochemische Tumorforschung der
Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. G. WERTH

DER EINFLUSS VON GANZKÖRPERBESTRAHLUNGEN AUF DIE OXIDATIVE PHOSPHORYLIERUNG IN ISOLIERTEN LEBERMITOCHONDRIEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1 9 7 1
vorgelegt von

Volkmar Will
geb. am 14.2.1943 in Zwickau/Sa.

Dekan : Prof. Dr. H. Kulenkampff
Referent : Prof. Dr. G. Werth

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6.3.1972 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Problemstellung und Literaturübersicht	1
II.	Ergebnisse	4
	A Die Bestimmung des P/O-Quotienten bei normalen Ratten	4
	1. Historisches	4
	2. Kombinierte Sauerstoff-Phosphat-Messung nach CHANCE und WILLIAMS	6
	3. Die Atmungskette	12
	4. Der Citratcyclus	14
	5. Substrate der Atmungskette	15
	6. Der P/O-Quotient bei unbestrahlten Ratten	17
	7. Die Problematik der kurzfristigen Messung des P/O-Quotienten	18
	B Vorversuche an ganzkörperbestrahlten Ratten mit 500 R und 750 R	21
	C Messung des P/O-Quotienten an mit 1000 R ganzkörperbestrahlten Ratten	24
	1. Succinat als Substrat	24
	2. β-Hydroxybutyrat als Substrat	26
	3. α-Ketoglutarat als Substrat	26

Seite

III. Diskussion 30

IV. Zusammenfassung 36

V. Experimenteller Teil 38

A Allgemeines 38

B Chemikalien 40

C Weiteres Material 40

D Tiermaterial 41

E Versuchsbeschreibungen 41

1. Isolierung der Mitochondrien 41

2. Messung der Mitochondrienkonzentration 44

3. Bestimmung des ATP 44

4. Sauerstoffmessung 46

a) Das Elektrodengefäß 48

b) Inbetriebnahme der Elektrode 50

c) Herstellen der Bezugselektrode 51

d) Elektrodenvorbereitung 52

e) Messung des O_2-Verbrauchs 55

F Bestrahlungen 58

VI. Literaturverzeichnis 60

I. Einleitung : Problemstellung und Literaturübersicht

Ionisierende Strahlen lösen eine ganze Reihe von chemischen Umsetzungen aus, die mittelbar oder unmittelbar in den Chemismus der Zelle eingreifen, und sich gut in die derzeit diskutierten Theorien der Cancerisierung einpassen. Hier ist besonders die mutationsauslösende Wirkung auf die Nukleinsäuren zu nennen, die theoretisch sowohl die Kern-DNS wie auch die DNS der Mitochondrien betreffen kann.
Für unsere Arbeit war es von besonderem Interesse, zunächst unabhängig von dem zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Mechanismus, die Beeinflussung der Mitochondrien, insbesondere der Atmungskette zu verfolgen.
Grundlegend für die Experimente waren die Versuche von van BEKKUM (1,2,3), der fand, daß bei Mäusen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen eine Schädigung der oxidativen Phosphorylierung bereits nachweisbar ist, ehe irgend welche andere Strahlenschäden beobachtet werden.
BEKKUM führte diese Versuche mit Mitochondrien von Thymus und Milz durch und verwendete Strahlendosen von 50 - 700 R. Die oxidative Phosphorylierung wurde 15 Minuten bis 4 Stunden nach der Bestrahlung verfolgt.
Bei 100 - 300 R zeigte sich 4 Stunden nach der Ganzkörperbestrahlung im Thymusgewebe mit Succinat als Substrat ein reduzierter P/O-Quotient, in der Milz waren für diesen Effekt nur 50 R erforderlich. Bei Bestrahlung

mit 700 R trat die Hemmung schon nach 2 Stunden auf. Im Gegensatz zu van BEKKUM fanden andere Autoren, z.B. GOLDFEDER auch an sogenannten strahlenunempfindlichen Geweben wie Leber die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien gehemmt, der P/O-Quotient war erniedrigt.

Im gleichen Sinne verliefen die Versuche anderer Autoren wie NITZ-LITZNOW/BÜHRER (25). Weiter Literaturangaben liefern uneinheitliche Ergebnisse. Verschiedene Versuchsanordnungen mögen für die differierenden Befunde verantwortlich sein.

Bei der großen Bedeutung, die die oxidative Phosphorylierung für das Zelleben hat und im Hinblick auf die noch offene Frage, wo primär der entscheidende Angriff in der Zelle erfolgt, im Cytoplasma oder im Kern, erschien es uns lohnend, mit einer neuen und sehr empfindlichen Technik die Atmungskapazität von Leberzellmitochondrien nach "in vivo" Bestrahlungen zu überprüfen und gleichzeitig den P/O-Quotienten, d.h. auch die ATP-Bildung zu messen, zumal die eingehenden Versuche von van BEKKUM schon lange zurückliegen. Auch weitere experimentelle Ergebnisse in dieser Richtung sind nicht neuesten Datums.

Übersichten über bisher vorliegende Ergebnisse geben folgende Autoren: SCHERER/STENDER (30), ERRESH/FORSSBERG (14) und STREFFER (32).

Alle vorliegenden Versuche waren mit der WARBURG-Methode durchgeführt worden, die vor allem bezüglich des Zeitfaktors gewisse Schwierigkeiten bietet. Bis zur eigentlichen Messung vergehen doch allein durch die Äquilibrierung 10 - 15 Minuten, und die Atmungsmessung selbst dauert etwa 20 Minuten. Man benötigt demnach für einen Versuch 30 - 35 Minuten. Bei der hier benutzten polarographischen Methode sind im Höchstfalle für den gesamten Arbeitsgang nach Isolierung der Mitochondrien 10 Minuten erforderlich.
Die Zeitersparnis beträgt somit ungefähr 25 Minuten, was unter Umständen bei den Mitochondrien von bestrahlten Tieren einen Einfluß auf die Werte des P/O-Quotienten haben könnte.
Besonderer Wert wurde in unseren Versuchen auf die Zeitabhängigkeit der Messung der endogenen Atmung vom Zeitpunkt der Bestrahlung ab gelegt. Hierbei ist die Reaktion als solche vom Substrat abhängig und spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle.
Beispielsweise wurden bei der Bestrahlung mit 1000 R in der Zeit von 1 Stunde bis zu 4 Tagen sieben Intervalle gewählt und gemessen.
Nach einleitenden Versuchen mit 500 R und 750 R wurde auf Langzeitversuche verzichtet, da sie unergiebig erschienen.

II. Ergebnisse

A. Die Bestimmung des P/O-Quotienten bei normalen Ratten

1. Historisches

a) Seit es den Begriff des P/O-Quotienten gibt, sind verschiedene Methoden zu seiner Messung angewendet worden. Anfänglich wurde zur Sauerstoffmessung die manometrische Methode nach WARBURG benutzt, in den späteren Jahren trat mehr und mehr die Polarographie in den Vordergrund. Der größte Vorteil gegenüber der manometrischen Messung ist hierbei die Möglichkeit der fortlaufenden Aufzeichnung des Sauerstoffverbrauchs. Es gelingt damit, auch schnell ablaufende Vorgänge unmittelbar zu erfassen.

b) Die Bestimmung des energiereichen Phosphats gelang zunächst durch die Messung des Verbrauchs an anorganischem Phosphat im Reaktionsmedium während der endogenen Atmung. Wegen der Umständlichkeit dieses Verfahrens wurden andere Möglichkeiten und Methoden ersonnen, unter denen sich die enzymatischen am meisten durchgesetzt haben.

Insbesondere hat es sich bewährt, das gebildete ATP mit Hilfe von Hexokinase und Glucose in Glucose-6-Phosphat zu überführen.
Das Glucose-6-Phosphat wird dann mittels der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Gluconat-6-Phosphat-Lacton überführt, wobei das Coenzym NADP zu NADPH-H^+ reduziert wird. Diese Reduktion des Coenzyms kann spektralphotometrisch bei 340 oder 366 nm gemessen werden und ist proportional der ursprünglichen ATP Konzentration.
Die Reaktionsgleichungen zu den genannten enzymatischen Vorgängen laufen folgendermaßen ab:

1. Bei der Atmung im Elektrodengefäß reagiert das gebildete ATP nach

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{ADP}$$

2. In der Küvette reagiert das gebildete Glucose-6-Phosphat

$$\text{G-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-P-Dehydrogenase}} \text{NADPH} + H^+ + \text{Glucose-6-Phosphat-}\delta\text{-Lacton}$$

Eine ausführliche Darstellung und kritische Betrachtung der Methode geben SLATER (31) und HENLEY (18).

c) Den Versuch, sowohl Sauerstoff als auch Phosphat in einem Arbeitsgang zu bestimmen, machten CHANCE und WILLIAMS (8).

2. Kombinierte Sauerstoff/Phosphat-Messung nach CHANCE und WILLIAMS

CHANCE und WILLIAMS (8) gaben 1955 erstmalig ihr Verfahren zur schnellen Messung des P/O-Quotienten an. Sie benutzten dabei ebenfalls die polarographische Sauerstoffmessung - allerdings gebrauchten sie eine vibrierende Platinelektrode, was aber auf den P/O-Quotienten an sich ohne Einfluß ist. Dank der fortlaufenden Schreibung des Sauerstoffverbrauchs kann man begrenzte Mengen ADP zugeben und aus der Zustandsänderung der Atmungskette, d.h. Übergang vom Ruhezustand in den aktiven Zustand und umgekehrt, den P/O-Quotienten berechnen.

Der Vorteil dieses Vorgehens liegt auf der Hand: Wegfall der Phosphat- bzw. ATP-Messung, da ja aus dem Kurvenverlauf der Sauerstoffverbrauchskurve direkt auf die Bildung des energiereichen Phosphats geschlossen werden kann.

Das Verfahren nach CHANCE und WILLIAMS sollte in dieser Arbeit angewendet werden. Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis mit verschiedenen Substraten.

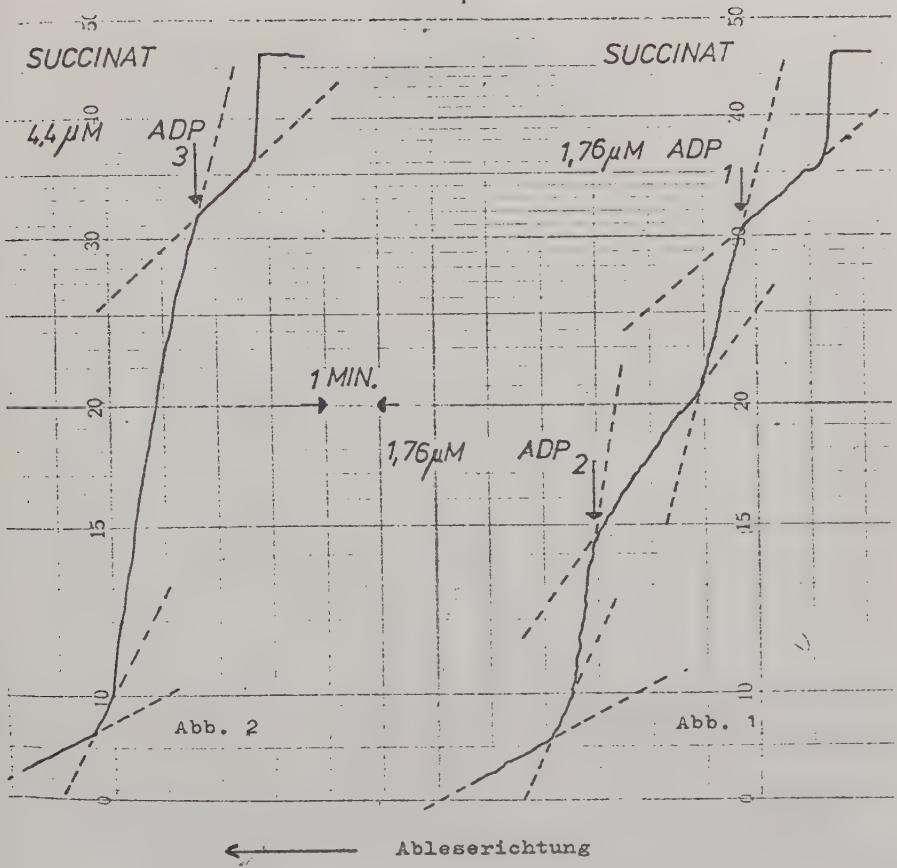


Abbildung 1

Endogene Atmung mit Succinat als Substrat.Methode nach CHANCE und WILLIAMS (8)
Bei 1 und 2 jeweils Zugabe von 1.76 µM ADP

Abbildung 2

Endogene Atmung mit Succinat als Substrat.Methode nach CHANCE und WILLIAMS (8)
Bei 3 Zugabe von 4.4 µM ADP

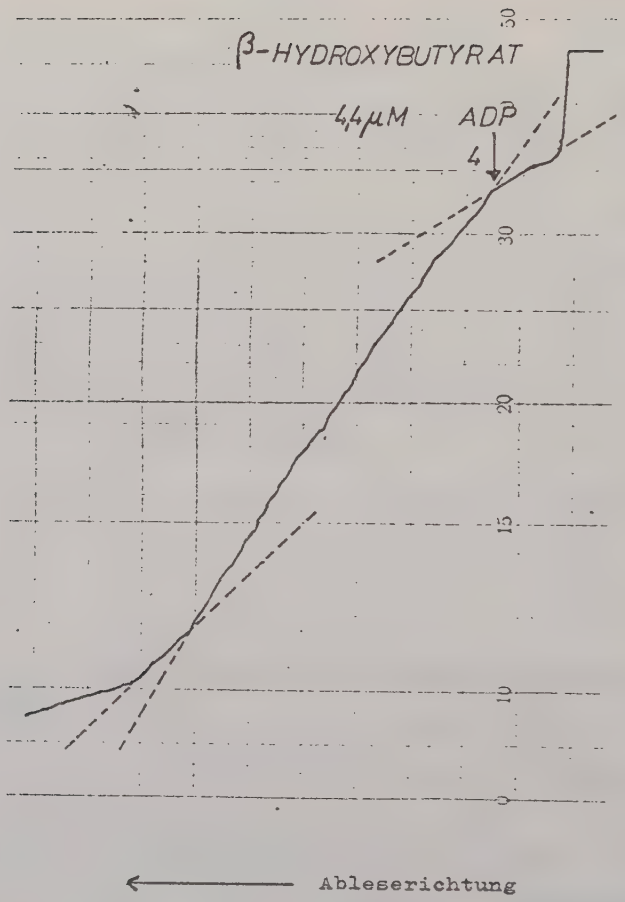


Abbildung 3

Endogene Atmung mit β-Hydroxybutyrat als Substrat.
Methode nach CHANCE und WILLIAMS (8)
Bei 4 Zugabe von 4.4µM ADP

Das Inkubationsmedium ist im experimentellen Teil, Abschnitt E 4a beschrieben. Allerdings wurde hier keine Hexokinase und keine Glucose zugegeben.

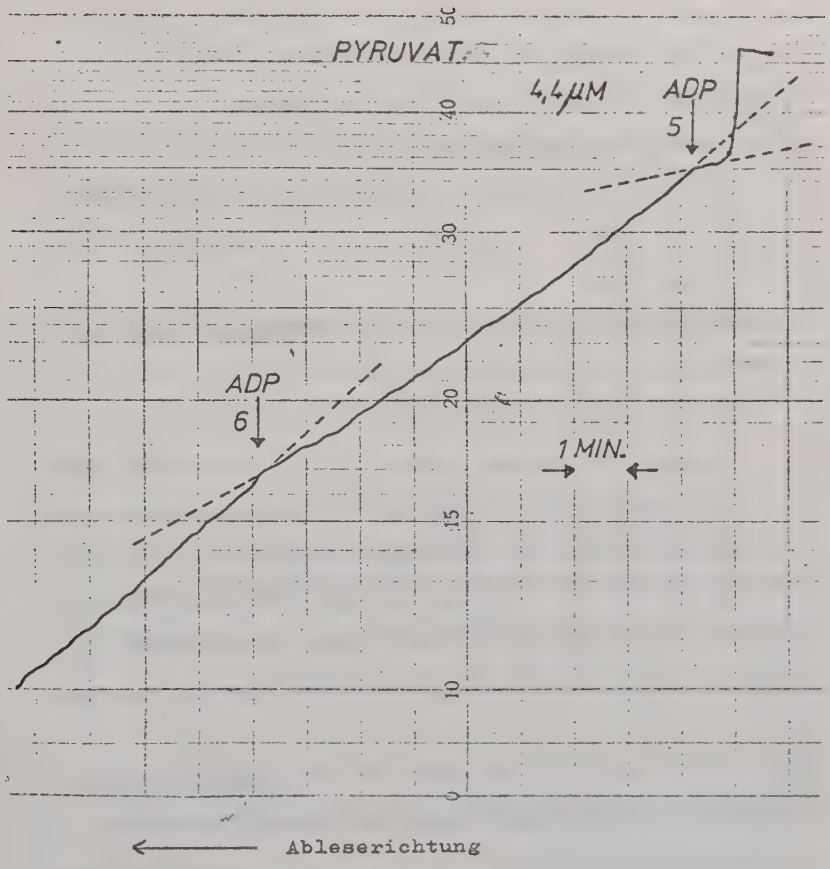


Abbildung 4

Endogene Atmung mit Pyruvat als Substrat. Methode nach CHANCE und WILLIAMS (8)
Bei 5 und 6 Zugabe von je 4.4 µM ADP

Der Übergang vom ruhenden Zustand der Atmungskette in den aktiven nach ADP-Zugabe ist bei Succinat als Substrat in Abbildung 1 und 2 sehr gut zu beobachten.

Wie aus den Kurven zu ersehen, wurde bei 1 und 2 je 1.76 µM ADP zugegeben, bei 3 4.4 µM ADP.

Der Sauerstoffverbrauch betrug bei :

1 = 1.1 Atome O_2 (1/2 Mol O_2 entspricht

2 = 0.84 " 1 Atom O_2)

3 = 2.62 "

Die Umrechnung auf den P/O-Quotienten ergibt also bei

1 = 1.76 / 1.1 = 1.6

2 = 1.76 / 0.84 = 2.1

3 = 4.4 / 2.62 = 1.68

Damit liegt der P/O-Quotient für Succinat durchaus im Bereich der Norm, aber die Streuung ist beträchtlich.

Im Prinzip zeigt die Veratmung von β-Hydroxybutyrat in Abbildung 3 den gleichen Ablauf wie bei Succinat als Substrat.

Bei 4 wurden 4.4 µM ADP zupipettiert. Der Übergang in die aktive Atmung ist bei β-Hydroxybutyrat nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Succinat, d.h. der Winkel zwischen Ruheatmung und aktiver Atmung ist spitzer. Dennoch können die Übergänge mit genügender Sicherheit abgelesen werden.

Der Sauerstoffverbrauch betrug 2.25 Atome O_2 und aus der bekannten Menge ADP errechnet sich ein P/O-Quotient von

4.4 / 2.25 = 1.96

Damit liegt dieser Wert unter der Literaturnorm, die ihn mit 2 - 3 angibt und um 30 % unter dem Durchschnittswert der Methode,die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die Abbildung 4 zeigt die oxidative Phosphorylierung mit Pyruvat als Substrat. Der Übergang vom ruhenden in den aktiven Zustand ist hier bei Zugabe von ADP genau abzulesen.
Im Gegensatz zu den Abbildungen 1 - 3 ist der entgegengesetzte Übergang, nämlich vom aktiven in den ruhenden Zustand nicht abzulesen.
Erst bei erneuter Zugabe von ADP ist ein etwas steilerer Verlauf der Sauerstoffverbrauchskurve zu registrieren.

Schlußfolgerungen:

Wie in den vorangehenden Abschnitten dargelegt,hat sich die Methode der kombinierten Sauerstoff/Phosphat-Messung nach CHANCE und WILLIAMS mit unserer apparativen Anordnung nicht bewährt.
Wir sind daher zu der Methode der getrennten Messung von Sauerstoff und ATP übergegangen, wie sie auch im experimentellen Teil beschrieben ist.
Hierbei halten sich die Schwankungen des P/O-Quotienten

bei den verschiedenen Substraten in sehr engen Grenzen, wie deutlich aus Abbildung 7 zu ersehen ist. Durch die Doppelbestimmung des ATP erhöht sich zudem die Sicherheit bei jeder Messung.

3. Die Atmungskette

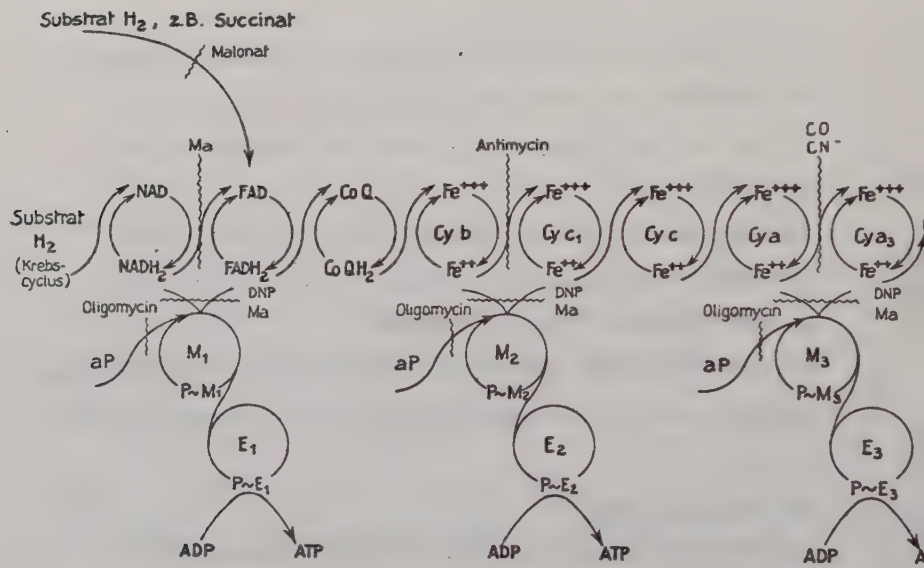


Abbildung 5

Reihenfolge der Redoxsysteme in der Atmungskette. Gleichfalls ist das Schema der oxidativen Phosphorylierung nach LEHNINGER mitverwertet worden. Wichtige Hemmstoffe der Atmungskette und ihre Angriffsstellen wurden mit Wellenlinien eingetragen.

Ma = Malachitgrün, DNP = Dinitrophenol

M_1, M_2, M_3, sowie E_1, E_2, E_3, = Überträger-Proteine

Die Kenntnisse über wechselseitige Beziehungen des "Multi-Enzym-Komplexes" Atmungskette dürfen als relativ gut gesichert gelten.

Wie KARLSON (20) kann man die Bedeutung der Atmungskette dahingehend umreißen, daß hier "Redoxkaskaden" vorliegen, auf deren einzelnen Stufen freie Energie der Oxydation als chemische Energie abgefangen wird. Die Abbildung 5 zeigt die einzelnen Stufen der Atmungskette einschließlich dem gleich zu besprechenden Schema der oxidativen Phosphorylierung.

Besonders hingewiesen sei auf die zwei Möglichkeiten der Substrateinschleusung - einmal über NAD, das andere Mal über FAD. Die Ausbeute an ATP hängt unmittelbar von diesen beiden Coenzymen ab. Sie beträgt bei der Oxydation über $NADH_2$ 3 Mole ATP, bei der Oxydation über $FADH_2$ nur 2 Mole ATP, da die erste Stufe der oxidativen Phosphorylierung hierbei umgangen wird.

Von diesen beiden Möglichkeiten der Substrateinschleusung wird in dieser Arbei auch Gebrauch gemacht, da man bei eventuellen Veränderungen des P/O-Quotienten unter Umständen die Störung lokalisieren kann.

Große Bedeutung hat die enge Kopplung der Succinat-Dehydrogenase mit der Atmungskette, da das Succinat eine Zwischenstufe des Citronensäurecyclus ist.

Die Bildung der chemischen Energie in der Atmungskette wird dazu benutzt, aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu bilden. Diesen Vorgang nennt man die "oxidative Phosphorylierung".

4. Der Citratcyclus

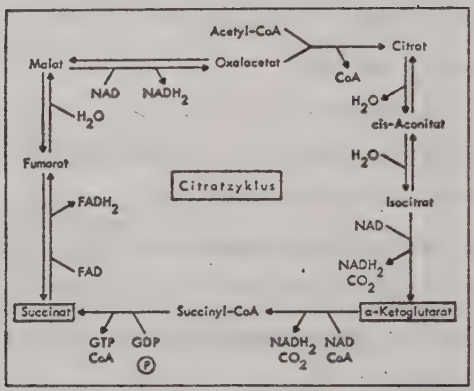


Abbildung 6

Der Citratcyclus
Aus BUDDECKE "Grundriß der Biochemie" (7)

Die Bedeutung des Citratcyclus liegt darin,daß hier Zwischenprodukte gebildet werden, die entweder zu Aufbauleistungen der Zelle gebraucht und abgezweigt werden oder zur Energiegewinnung verwertet werden.In dieser Arbeit interessiert nur das letztere.
In Abbildung 6 ist ein Schema des Citronensäurecyclus wiedergegeben. In unserem Zusammenhang sind hauptsächlich die Substrate Succinat und α-Ketoglutarat von Belang.Diese sind über die Coenzyme NAD und FAD

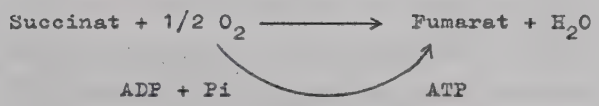
eng mit der Atmungskette verbunden und die Atmungskette läuft vorwiegend in Verbindung mit dem Citronensäurecyclus ab.
Auf andere Reduktionsäquivalente wie -Hydroxybutyrat wird später eingegangen.

5. Die Substrate der Atmungskette

Wie die vorausgehende Darlegung zeigt, gibt es mehrere Verbindungen, die sich als Substrate für die Atmungskette eignen. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden verwendet:

a) Succinat

Succinat ist ein Zwischenstück des Citronensäurecyclus. Im Gegensatz zu den beiden anderen Substraten dieser Versuchsserie wird es vom Flavoproteinkomplex der Atmungskette dehydriert und nicht durch Vermittlung von NAD. Von den 3 Phosphorylierungsschritten der Atmungskette werden folglich nur 2 durchlaufen. Die vollständige Reaktionsgleichung lautet folgendermaßen:



b) α-Ketoglutarat

α-Ketoglutarat kommt als einem Glied des Citronensäurecyclus besondere Bedeutung zu. Wird hier die Oxydation gehemmt, so ist die Funktion des Cyclus unterbrochen.

Infolge der zusätzlichen Substratkettenphosphorylierung werden bei der Oxydation von einem Mol α-Ketoglutarat 4 Mole ATP gebildet.

Diese Substratkettenphosphorylierung, im Schema der Abbildung 6 mit P bezeichnet, läuft im Übergang von Succinyl-CoA zu Succinat ab. Primär wird die Energie hier auf Guanosintriphosphat (GTP) übertragen, das aber mit dem ADP - ATP-System im Gleichgewicht steht.

Um den Abbau des hierbei entstandenen Succinat zu hemmen, wird der Reaktionsmischung Malonat zugegeben; diese Hemmung ist auch aus der Abbildung 5 ersichtlich.

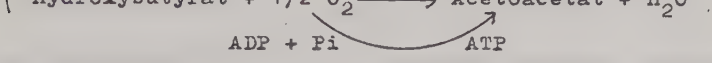
Die Gleichung der Gesamtreaktion lautet:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + 1/2\ O_2 \xrightarrow[ADP + Pi]{\qquad\qquad} \underset{ATP}{\text{Succinat}} + CO_2$$

c) β-Hydroxybutyrat

β-Hydroxybutyrat wurde als drittes Substrat in dieser Arbeit verwendet; es ist Teil des Fettstoffwechsels und wird mittels NAD oxydiert. Es werden hierbei alle

3 Schritte der Atmungskette durchlaufen und es resultiert folglich ein P/O-Quotient von 3.
Die Gesamtreaktion lautet:



6. Der P/O-Quotient bei unbestrahlten Tieren

Um eine Basis für unsere Untersuchungen zu gewinnen, wurden zunächst Normalratten untersucht. Dies war um so wichtiger, als sich einzelne Stämme in ihrer Reagibilität deutlich unterscheiden können. Die Werte des P/O-Quotienten für die besprochenen Substrate bei Normaltieren zeigt die Abbildung 5.
Die Quotienten stimmen mit den Angaben in der Literatur recht gut überein. Einen Vergleich zeigt die folgende Aufstellung:

a) Succinat

1.8 bei KADENBACH (19)

1 - 2 bei KOIVUSALO/SLATER (21)

2.2 bei den eigenen Untersuchungen

b) β-Hydroxybutyrat

2.2 - 2.3 bei KADENBACH (19)

2.2 - 2.7 bei DEVLIN/BEDELL

2.8 bei BOITEUX (6)

2.9 bei den eigenen Untersuchungen

c) α-Ketoglutarat

3 - 4 bei KOIVUSALO/SLATER (21)

3.8 bei BOITEUX (6)

3.5 bei den eigenen Untersuchungen

Lediglich Succinat zeigt einen um etwa 10 % höheren Wert, d.h. 2.2, gegenüber den in der Literatur als Maximum angegebenen Werten, d.h. 2 (KOIVUSALO/SLATER, 21).

Der Grund für diese Erhöhung liegt wahrscheinlich an der - im Vergleich zu den anderen beiden Substraten - kurzen Sauerstoffverbrauchsmessung von 4 Minuten. Die schnelle Atmung rührt daher, daß die vorgelegte Menge Substrat nach 4 Minuten verbraucht ist. Eine doppelte Konzentration würde naturgemäß die Atmung verlängern, stört aber die für alle Messungen einheitliche Elektrolyt- und Substratkonzentrationszusammensetzung.

Im folgenden Abschnitt wird dieses Problem noch eingehend diskutiert.

7. Die Problematik der kurzfristigen Messung des Sauerstoffverbrauchs zur Ermittlung des P/O-Quotienten

Es ist bekannt, daß gerade bei kurzfristigen Messungen, d.h. unterhalb von etwa 5 Minuten, der P/O-Quotient erhöht sein kann, vgl. hierzu SCHACHINGER et al. (28),

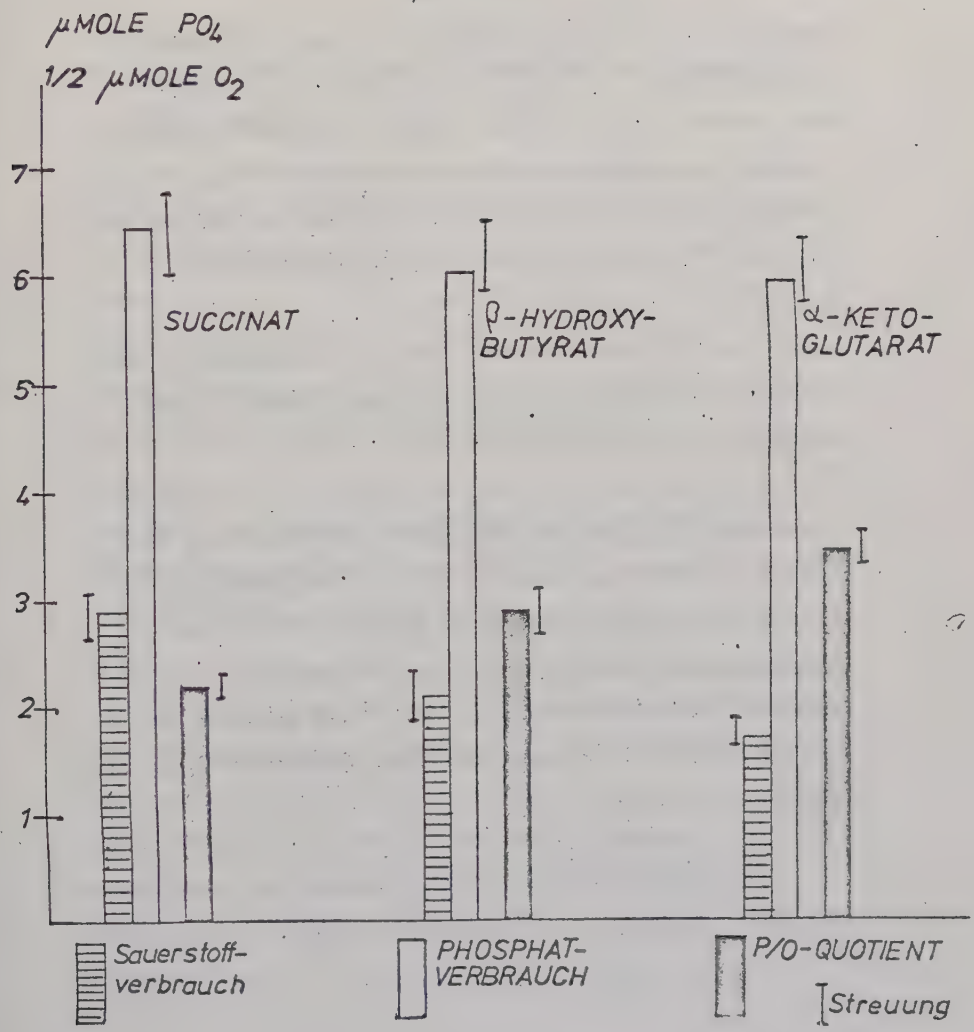


Abbildung 7

Sauerstoffverbrauch, ATP-Bildung und P/O-Quotient bei unbehandelten Tieren.
Alle Werte berechnet auf 5 mg Mitochondrienprotein und bezogen auf 10 Versuche je Substrat à 2 Ratten.

Atmungsdauer bei	Succinat	4 Minuten
	β-Hydroxybutyrat	10 "
	α-Ketoglutarat	10 "

van DAM (10), KOIVUSALO/SLATER (21) und KOIVUSALO et al. (22).

Man erklärt diesen Sprung ("jump") mit einem Mißverhältnis von Sauerstoffaufnahme und ATP-Bildung in den ersten Minuten, da im weiteren Verlauf der Beobachtung sich der P/O-Quotient wieder den üblichen Werten nähert.

Unter den hier angewendeten Versuchsbedingungen - Beendigung der Messung nach 4 Minuten - kommt dieser Ausgleich nicht mehr zum Tragen.

Allerdings spielt die Erhöhung des P/O-Quotienten bei Verwendung von Succinat als Substrat - denn nur hier werden 4 Minuten gemessen - für die Fragestellung in dieser Arbeit keine Rolle. Es sollen hier ja nur Veränderungen nach Bestrahlungen festgestellt werden. Folglich wird also lediglich von einem erhöhten Grundwert ausgegangen, dessen absoluter Zahlenwert hier vernachlässigt werden darf.

B. Vorversuche an ganzkörperbestrahlten Ratten mit 500 r und 750 r

Um überhaupt die Basis für die bei unserem Tierstamm wirksame Strahlendosis zu gewinnen, wurden Ganzkörperbestrahlungen mit 500 R und 750 R vorgenommen.
Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die Ergebnisse. Dabei wurden pro Messung 2 Tiere bestrahlt und nach dem entsprechenden Intervall (1 Stunde bis 7 bzw. 10 Tagen) getötet.
Aus den Abbildungen ist klar zu erkennen, daß bei diesen Strahlendosen eine eindeutige Tendenz zu einer Veränderung des P/O-Quotienten nicht zu beobachten ist.
Die P/O-Quotienten und damit der Sauerstoffverbrauch und die ATP-Bildung schwanken um den Mittelwert der Messung bei Normaltieren.
Dieser Mittelwert ist in Abbildung 8 nochmals mit abgebildet und bezieht sich in gleicher Weise auf Abbildung 9, da beide Zeichnungen im gleichen Maßstab gehalten sind.

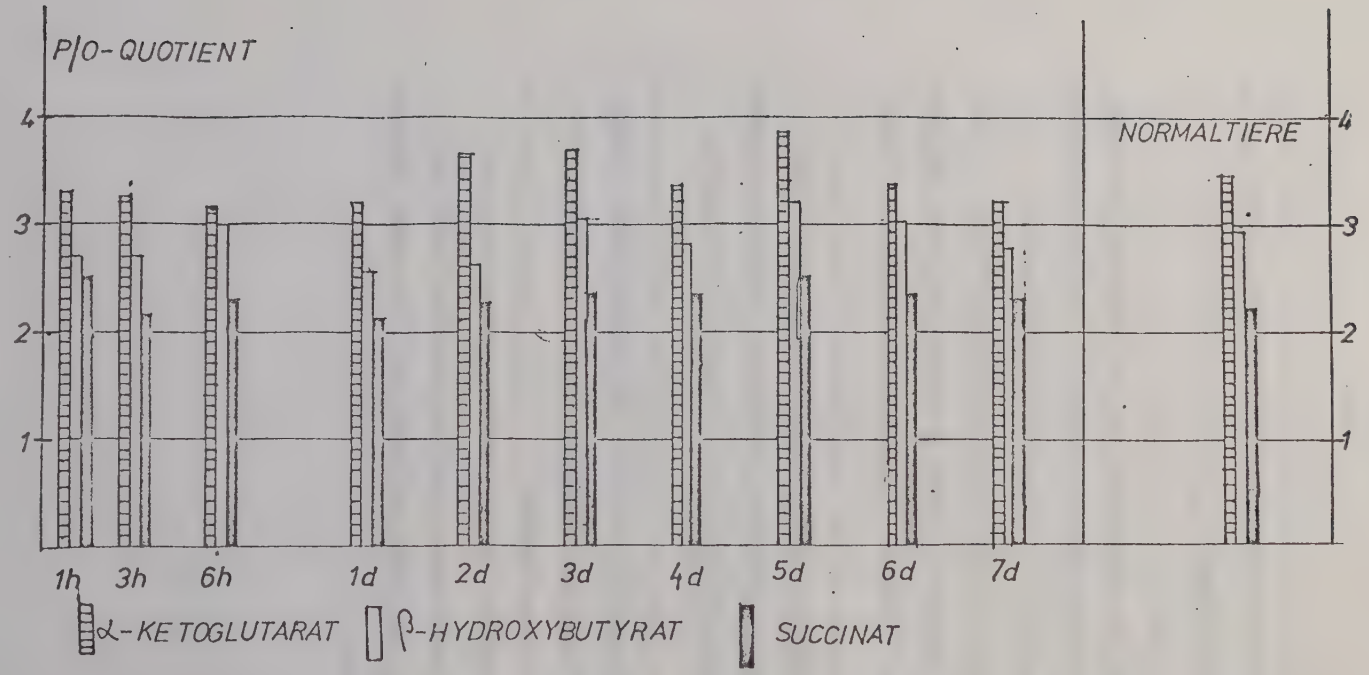


Abbildung 8

Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Bestrahlung mit 500 R
Jede Messung stellt einen Mittelwert von je 2 Tieren dar
Der Wert der Normaltiere entspricht einem Mittelwert aus 10
Messungen à 2 Tieren (s. auch Abb. 7)

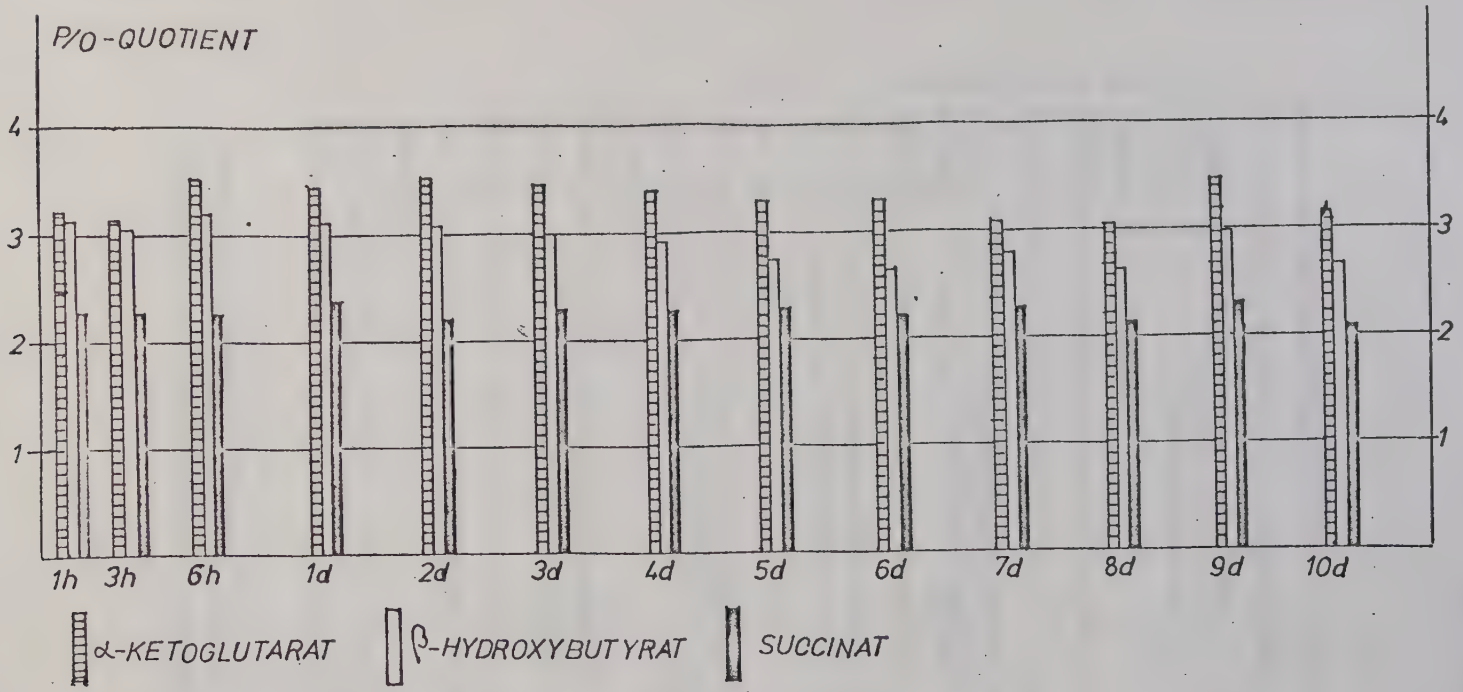


Abbildung 9

Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Bestrahlung mit 750 R
Jede Messung stellt einen Mittelwert aus je 2 Tieren dar
Die Werte für Normaltiere sind aus Abb. 8 zu entnehmen

C. Messung des P/O-Quotienten an mit 1000 R ganzkörperbestrahlten Ratten

Wie im Abschnitt B beschrieben, brachten die Bestrahlungsversuche mit 500 R bzw. 750 R keine verwertbaren Resultate.
Um doch noch eventuelle Veränderungen erfassen zu können, wurden die Tiere im Hauptversuch mit 1000 r bestrahlt. Dies entspricht einer $LD_{100/4\ d}$, d.h. nach Ablauf von 4 Tagen war von den bestrahlten Tieren keines mehr am Leben.
Jede Säule in den Abbildungen 10 bis 12 entspricht 10 Messungen, wobei zu jeder Einzelmessung die Lebern von zwei Tieren verwendet wurden. Sie stellt demnach einen Mittelwert von 20 Ratten dar.
Für den 4. Tag, d.h. für den Tag, an dem die Tiere nach einer Ganzkörperbestrahlung von 1000 R spätestens starben, ergaben sich Schwierigkeiten. Die meisten Tiere waren vor Ablauf dieser Zeitspanne bereits eingegangen. Es war daher nicht möglich, ebenfalls 10 Messungen durchzuführen, und wir mußten uns daher auf 5 Messungen beschränken.

1. Messung mit Succinat als Substrat

Die Abbildung 10 zeigt die Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Succinat als Substrat. Ein Einfluß

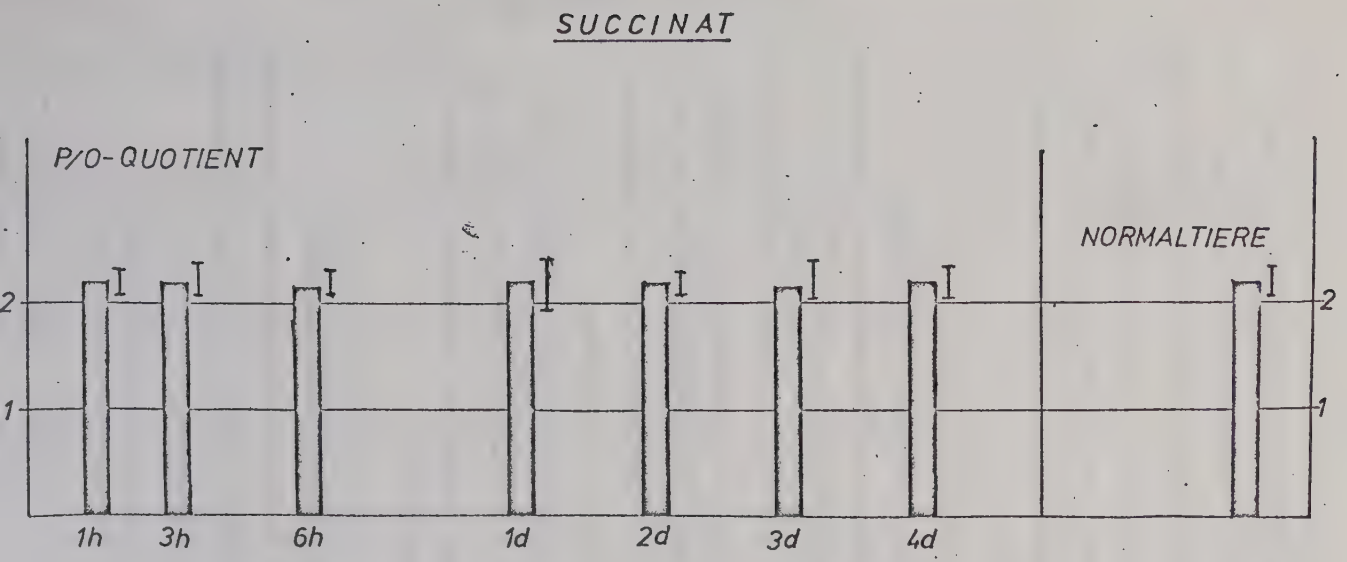


Abbildung 10

Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Bestrahlung mit 1000 R
Succinat als Substrat
Jede Säule entspricht einem Mittelwert aus 10 Messungen à 2 Tieren
Am 4. Tag nur 5 Messungen

auf den Quotienten ist hier nicht zu erkennen. Im Gegenteil fällt die geringe Streuung auf, die sich nicht wesentlich von der bei unbestrahlten Tieren unterscheidet. Diese Untersuchungen mit Succinat stehen in vollem Einklang mit der Literatur, vgl. STREFFER (32), wobei sich gerade dieses Substrat und die Succinat-Dehydrogenase als äußerst widerstandsfähig erwiesen haben.

2. Messung mit β-Hydroxybutyrat als Substrat

Als zweites Substrat wurde β-Hydroxybutyrat untersucht. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 11.
Im Unterschied zu Succinat wird dieses Substrat gleich zu Beginn der Atmungskette eingeschleust und durchläuft demzufolge drei Phosphorylierungsschritte. Für das Verhalten des P/O-Quotienten gilt hier ähnliches wie bereits bei Succinat beschrieben.
Wesentliche Änderungen zeigen sich nicht. Es fällt aber auf, daß die Streuung etwas größer wird und daß sich am 4. Tag eine angedeutete Erniedrigung des P/O-Quotienten erkennen läßt.

3. Messung mit α-Ketoglutarat als Substrat

Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Substraten wird bei α-Ketoglutarat zusätzlich eine Substratkettenphosphorylierung durchlaufen.

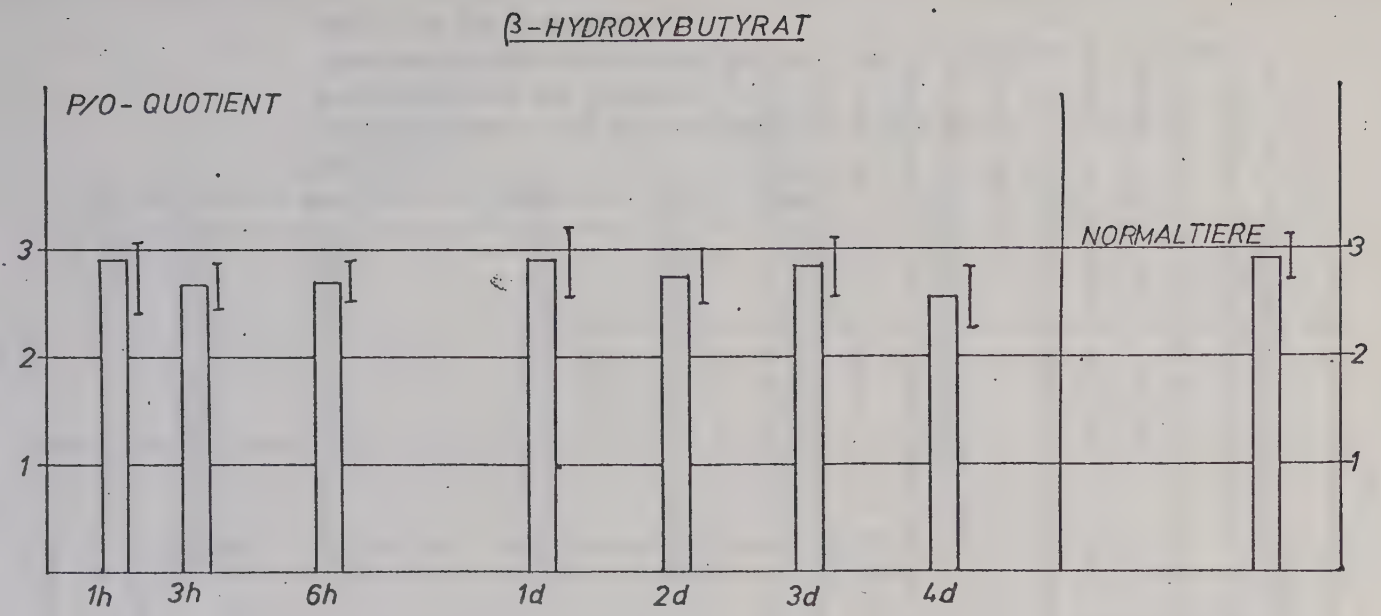


Abbildung 11

Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Bestrahlung mit 1000 R
β-Hydroxybutyrat als Substrat
Jede Säule entspricht einem Mittelwert von 10 Messungen à 2 Tieren
Am 4. Tag nur 5 Messungen

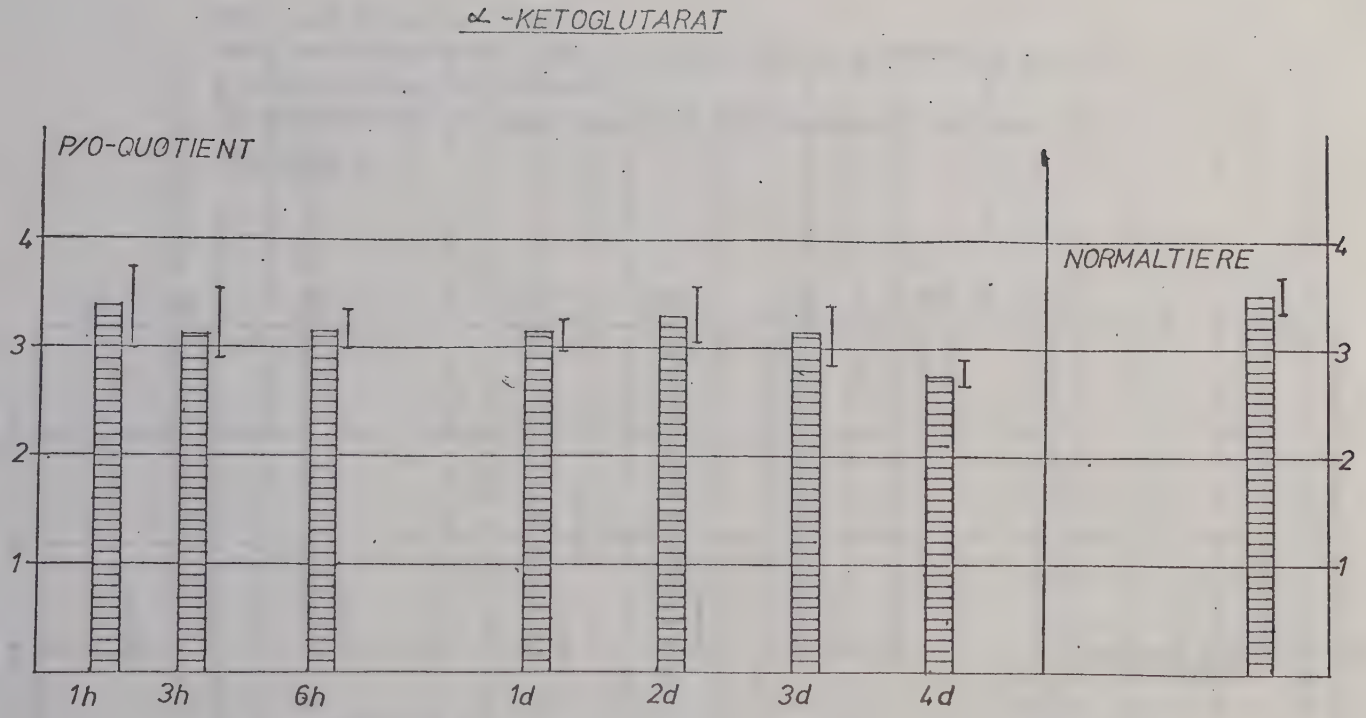


Abbildung 12

Zeitabhängigkeit des P/O-Quotienten bei Bestrahlung mit 1000 R

α-Ketoglutarat als Substrat

Jede Säule entspricht einem Mittelwert aus 10 Messungen à 2 Tieren

Am 4. Tag nur 5 Messungen

Bei dem zeitabhängigen Verlauf des P/O-Quotienten in Abbildung 12 zeigt sich während der ersten Stunden eine verstärkte Streuung im Vergleich zu den folgenden Werten und zu dem Normalwert.
Schon der 3-Stundenwert erreicht nicht mehr den Wert unbehandelter Tiere und bleibt auch bis zum Schluß immer darunter.
Insbesondere fällt eine gegen den 4. Tag zunehmende Erniedrigung des P/O-Quotienten auf, der am 4. Tag einen Durchschnittswert von 2.75 erreicht - im Vergleich zu 3.45 bei unbestrahlten Tieren.
Dies entspricht einer Reduktion des P/O-Quotienten um 20 %.

III Diskussion

Wie zu Beginn dieser Arbeit bereits erwähnt, existiert eine umfangreiche Literatur über den Einfluß ionisierender Strahlen auf den Säugetierstoffwechsel, insbesondere auch die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung. Der Großteil der Veröffentlichungen bezieht sich dabei auf die Milz, evt. noch Thymus und das Knochenmark als Organ der Blutbildung. Sie gelten als sogenannte strahlenempfindliche Gewebe.
Übereinstimmung besteht bei diesen Arbeiten insofern, als sich bei Strahlendosen von 500 R bis 700 R schon nach wenigen Stunden meßbare Veränderungen des P/O-Quotienten nachweisen lassen (vgl. hierzu die Literatur bei van BEKKUM (3), ERRERA (13), MAXWELL/ASHWELL (24), BENJAMIN/YOST (4), STREFFER (32) und van BEKKUM et al. (2)).
Die wenigen Berichte, die sich auf das Verhalten des P/O-Quotienten bei Lebermitochondrien beziehen, bieten ein unterschiedliches Bild:

1. BENJAMIN und YOST (4) fanden bei 800 R Ganzkörperbestrahlung und Succinat als Substrat und einem Zeitintervall zwischen Bestrahlung und Messung von 24 Stunden ein Absinken des P/O-Quotienten um 33 %.

2. Dagegen erniedrigte sich der P/O-Quotient bei den Untersuchungen von HALL et al. (17) schon nach 3 Stunden um 25 %, blieb bis 6 Stunden auf diesem Wert und stieg nach 24 Stunden wiederum auf den Ausgangswert an.
Die Versuchsbedingungen waren hier: 840 R Ganzkörperbestrahlung, als Substrate Pyruvat, β-Hydroxybutyrat, Citrat und Glutamat. Mit den verschiedenen Substraten zeigte sich jeweils das gleiche Verhalten.

In unseren Versuchen hingegen kamen wir zu folgenden Ergebnissen (bei 1000 R Ganzkörperbestrahlung) :

1. Bei Succinat als Substrat keine Veränderung

2. Bei β-Hydroxybutyrat als Substrat nur eine geringe Erhöhung der Steuung in den ersten Stunden nach der Ganzkörperbestrahlung

3. Bei α-Ketoglutarat als Substrat eine allmähliche Erniedrigung des P/O-Quotienten gegen den 4. Tag zu von 3.45 im Normalfall auf 2.75

Es bleibt nun noch zu klären, worauf letzten Endes die Unterschiede der in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse beruhen und wie das Verhalten der Atmungs-

kette unter Benutzung verschiedener Substrate und bei Belastung mit Strahlen zu interpretieren sind.

Ganz allgemein muß man unter "in vitro" und "in vivo" Bestrahlungen unterscheiden:

1. "in vitro" Bestrahlungen

Hierbei werden die bereits isolierten, d.h. aus dem natürlichen Zellverband herausgenommenen Mitochondrien bestrahlt.

Übereinstimmend wird in der Literatur festgestellt, so bei ERRERA (13) und STREFFER (32), daß erst bei den enormen Strahlendosen von 100 - 200 KR die oxidative Phosphorylierung bzw. der Sauerstoffverbrauch gehemmt werden.

"In vivo" akut tödliche Strahlendosen von 20 bis 60 KR haben dagegen keinen Einfluß auf die oxidative Phosphorylierung (vgl. auch ERRERA (13) und STREFFER (32)).

Es muß sich also bei den Veränderungen "in vitro" bei Anwendung extremer Strahlendosen von 100 und 200 KR um während oder gleich nach der Bestrahlung eintretende Schädigungen der Mitochondrien handeln. Man muß dabei eine direkte Strahlenwirkung auf das Multienzymsystem der Atmungskette diskutieren, wobei eine direkte Schädigung der Proteinstrukturen am wahrscheinlichsten ist.

2. "in vivo" Bestrahlungen

Das Erscheinungsbild der Veränderungen bei "in vivo" Bestrahlungen ist komplexer. Das geht schon daraus hervor, daß

a) die Schädigungen organabhängig sind

b) keine übereinstimmenden Resultate der verschiedenen Autoren vorliegen

c) Schädigungen erst nach einer Latenz von vielen Stunden bis zu mehreren Tagen auftreten; d.h. wir betrachten hier Späteffekte nach Bestrahlung mit für den Gesamtorganismus tödlichen Dosen

Da van BEKKUM bei Milzmitochondrien 2 Stunden nach Bestrahlung eine signifikante und nach 4 Stunden eine starke Abnahme des P/O-Quotienten registrierte, muß hier ein anderer Mechanismus diskutiert werden als bei Lebermitochondrien.
Da der Schaden wenige Stunden nach der Bestrahlung auftritt, sind Sekundärvorgänge der intakten, lebenden Zelle unter Strahleneinfluß in Betracht zu ziehen.
Die außerordentliche Vielseitigkeit und die Stoffwechselkapazität der Leber könnten z.B. in der Lage sein, einen primären strahlenbedingten Effekt abzu-

fangen, während ein hochspezialisiertes System wie Milz und Thymus hierzu nicht in der Lage sind.

In dieser Arbeit zeigte sich, daß von einer meßbaren Schädigung der oxidativen Phosphorylierung erst bei 1000 R Ganzkörperbestrahlung und nach 4 Tagen Intervall gesprochen werden kann. Bemerkenswerterweise ist diese Schädigung aber nur mit α-Ketoglutarat als Substrat zu registrieren.

Eine einleuchtende Erklärung für diese Veränderungen ist zur Zeit noch nicht zu geben. Es scheint auch kaum möglich, eine einzige morphologische Organveränderung hierfür verantwortlich machen zu können.

Doch sei darauf hingewiesen, daß bei α-Ketoglutarat im Unterschied zu den beiden anderen verwendeten Substraten als zusätzlicher Schritt die Substratkettenphosphorylierung hinzutritt. Vielleicht ist hier ein Ansatzpunkt für biochemische Veränderungen zu suchen, da sich ja bei Succinat und β-Hydroxybutarat keine wesentlichen Änderungen des P/O-Quotienten zeigten.

Man kann aber auch eine plurikausale Ursache im Sinne einer allgemeinen Stoffwechselstörung wenige Stunden vor dem Exitus letalis diskutieren. Denn die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt, d.h. gegen den 4. Tag zu (nach der Bestrahlung) in einem desolaten Zustand, wobei blutige Durchfälle, Konjunktivalblutungen und Gleichgewichtsstörungen bestanden.

Schließlich ist in Betracht zu ziehen, daß in dieser Arbeit eine sehr empfindliche Methode zur Sauerstoffmessung angewendet wurde, die insbesondere den Zeitaufwand für die eigentliche Messung auf ein Minimum reduziert (4 bzw. 10 Minuten). Äquilibrierungen und längerdauernde Messungen wie bei der Methode nach WARBURG fallen bei der Polarographie weg.
Alle Messungen des P/O-Quotienten bei bestrahlten Ratten von anderen Autoren, die in dieser Arbeit zitiert wurden, arbeiteten mit der WARBURG-Methode, die doch einen größeren Zeitverlust bedingt.
Vielleicht ist auch dies eine Erklärung für die divergierenden Resultate beim Vergleich mit der Literatur, da die Mitochondrien bei derart strahlengeschädigten Tieren besonders leicht und schnell altern und somit Artefakte produziert werden können.
Man könnte aus den vorgelegten Ergebnissen demnach folgern, daß in vivo nicht die Atmungskette als solche durch wirksame Strahlendosen beeinträchtigt wird, sondern noch nicht zu definierende andersartige Einflüsse letztlich auch eine sekundäre Wirkung auf die oxidative Phosphorylierung ausüben.

IV Zusammenfassung

1. In der Literatur finden sich unterschiedliche Resultate über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die oxidative Phosphorylierung in den verschiedenen Geweben.

2. In dieser Arbeit wird über die Wirkung von Ganzkörperbestrahlungen im Bereich von 500 R bis 1000 R auf die oxidative Phosphorylierung bei Lebermitochondrien von Ratten berichtet. Die Intervalle zwischen Bestrahlung und Tötung der Tiere lagen im Bereich von 1 Stunde bis 10 Tagen.

3. Es wurden hierbei die Polarographie zur Sauerstoffmessung und eine enzymatische Methode zur Bestimmung des ATP angewendet.

4. Im Bereich von 500 R bis 750 R zeigte die oxidative Phosphorylierung bei den Substraten Succinat, β-Hydroxybutyrat und α-Ketoglutarat keine Veränderungen.

5. Bei 1000 R Ganzkörperbestrahlung war die Schädigung substratabhängig. Succinat zeigte keine Reaktion, bei β-Hydroxybutyrat war die Streuung anfänglich etwas verstärkt.

Erst bei α-Ketoglutarat ergab sich bei der angeführten Strahlendosis, die einer $LD_{100/4\ d}$ entspricht, am 4. Tag eine Verminderung des P/O-Quotienten von normal 3.45 auf 2.75.

6. Demnach zeigen auch unsere Versuche der Messung der oxidativen Phosphorylierung mit der empfindlichen polarographischen Methode der Messung des Sauerstoffverbrauchs - kombiniert mit der enzymatischen Bestimmung von ATP - daß Lebermitochondrien unter den von uns angewendeten Bedingungen praktisch strahlenunempfindlich sind.

V Experimenteller Teil

A. Allgemeines

1. Die pH-Messungen wurden mit einer geeichten Glaselektrode der Fa. Metrohm, Herisau, Schweiz durchgeführt.

2. Die Inkubationen erfolgten in einem Wasserbad von 25 ° C.

3. Die photometrischen Bestimmungen von ATP und Eiweiß wurden mit dem Spektralphotometer der Fa. Netheler + Hinz, Hamburg-Eppendorf vorgenommen. Es wurden Filter der Wellenlängen 366 bzw. 546 nm verwendet.

4. Zur Trübungsmessung bei 520 nm wurde das Spektralphotometer der Fa. Beckmann, Modell DK 1A benützt.

5. Die Sauerstoffmessungen wurden mit einer stabilisierten Ganzglas-Platinelektrode nach GLEICHMANN/ LÜBBERS durchgeführt, die die Fa. Eschweiler, Kiel lieferte.
Die Polarisationsspannung für die Elektrode lieferte ein batteriegespeister, transistorstabilisierter Spannungskonstanthalter, hergestellt im Max-Planck-

Institut für Arbeitsphysiologie, Dortmund. ++

6. Für die Aufzeichnung der Sauerstoffeich- und -verbrauchskurve wurde ein log-Kompensationsschreiber "Servogor" Typ RE 514 der Fa. Goerz,Wien benützt und ein Nanoampèremeter der Fa. Knick,elektronische Meßgeräte, Wien.

7. Die Aufarbeitung des Gewebes zur Gewinnung der Mitochondrien erfolgte in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel der Fa. Braun, Melsungen.
Zentrifugiert wurde an der Kühlzentrifuge 108 E der Fa. Runne, Heidelberg.

8. Die Bestrahlungen wurden an dem Siemens Therapiegerät "Stabilipan" durchgeführt.
Spannung : 200 KV
Strom : 15 mA
Filter : 1 mm Cu

++
Wir bedanken uns bei Prof. Zilliken für die Überlassung der Elektrode und bei Prof. Lübbers für den Spannungskonstanthalte

B. Chemikalien

Substanz	Herstellerfirma	Reinheitsgrad
Glucose-6-P-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim	5 mg Eiweiß/ml
Hexokinase	"	10 mg Eiweiß/ml
α-Ketoglutarat	"	
Succinat	"	
NADP - Na_2	"	
Pyruvat	"	
β-Hydroxybutyrat	Serva	rein
Glycylglycin	"	p. A.
EDTA	Fluka	puriss.
Malonsäure	"	"
Triäthanolamin-hydrochlorid	Boehringer	"
Saccharose	Merck	für die Bakteriologie

Alle anderen Chemikalien waren p. A. Qualität der Fa. Merck

C. Weiteres Material

Das Elektrodencellophan war gewöhnliches Haushaltscellophan der Fa. Kalle

Die Teflonmembran (25 μ) wurde von der Fa. Eschweiler, Kiel bezogen.

D. Tiermaterial

Untersucht wurden Ratten des eigenen Inzuchtstammes "H. W.", der nach den genetischen Erfordernissen als "erbrein" bezeichnet werden kann. (40 Generationen konsequenter Bruder-Schwester Inzucht).
Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren die Tiere 3 - 8, in Ausnahmefällen 12 Monate alt.

E. Versuchsbeschreibungen

1. Isolierung der Mitochondrien aus Rattenlebern

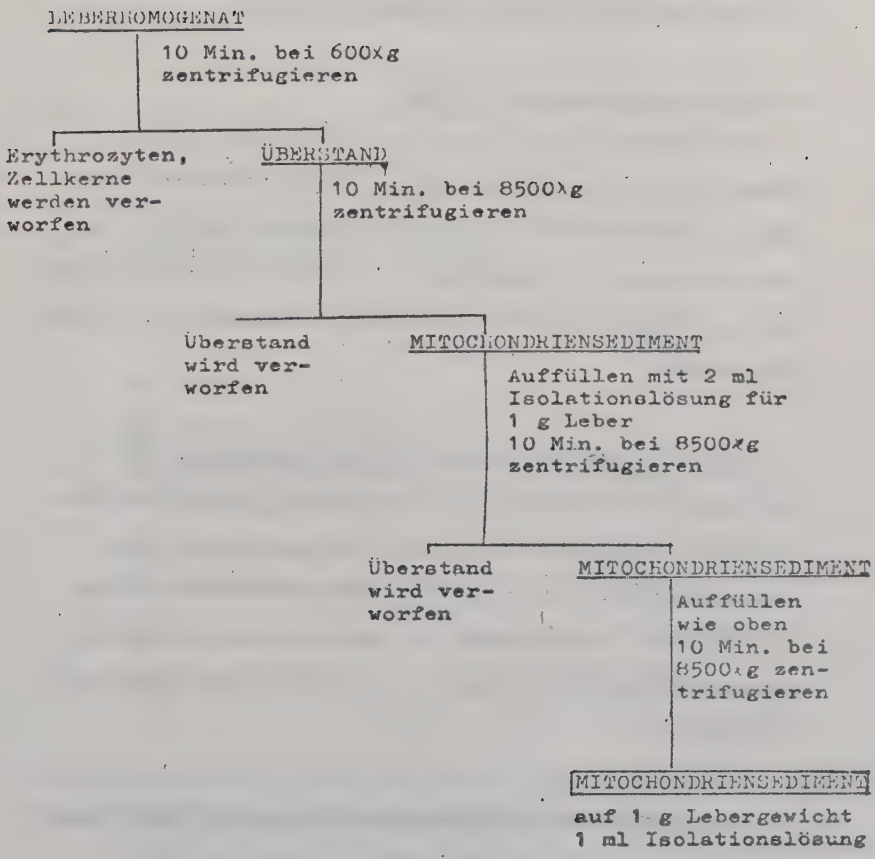
Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die Methode von WEINBACH (34).
Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte im Kühlraum bei einer Temperatur von 0 - 3 °C. Sie soll so schnell wie möglich durchgeführt werden.
Zwei Ratten (150 - 250 g) wurden durch Genickschlag getötet, die Lebern rasch entnommen (im Durchschnitt innerhalb von 30 Sekunden) und in etwa 250 ml eiskalte Isolationslösung gebracht.
Diese Isolationslösung enthielt:

0.25 M Saccharose
0.02 M TRAP
pH 7.1 - 7.2

(Die Konzentration von 20 mM TRAP in der Isolationslösung entspricht nach den Verdünnungen einer Konzentration von 1 mM im Reaktionsgefäß der Elektrode). Die Lebern blieben einige Minuten zur Temperaturangleichung im Isolationsmedium. Sie wurden dann kurz auf Filterpapier getrocknet, mit einem Porzellanpistill durch ein Kunststoffsieb (Maschenweite 1 mm) in ein Becherglas getrieben.
Das Becherglas enthielt 50 ml Isolationslösung und wurde nachher auf ein Verhältnis:

Leberbrei (g) : Isolationslösung (ml) = 1 : 9

aufgefüllt.
Anschließend wird mit dem Potter-Elvejhem-Homogenisator homogenisiert, wobei man langsam bis zum ersten vollständigen Durchgang, dann ca. eine Minute bis zur vollständigen Durchmischung rührt.
Den Verlauf der Zentrifugation zur Isolierung der Mitochondrien zeigt das Schema 1.
Nach der zweiten Zentrifugation muß die abgeschiedene Fettschicht sorgfältig mit Filterpapier entfernt werden. Nach der 2., 3. und 4. Zentrifugation wird das Mitochondriensediment durch langsame Rotation mit dem Homogenisator im Isolationsmedium resuspendiert.



Schema 1

Reihenfolge der Zentrifugationsschritte zur Isolierung der Mitochondrien aus Rattenlebern.
Isolation in Anlehnung an WEINBACH (34).

2. Messung der Mitochondrienkonzentration

a) Trübungsmessung bei 520 nm

Um eine schnelle und relativ genaue Einstellung der einzelnen Mitochondriensuspensionen zu erhalten, wurden die einzelnen Mitochondrienpräparationen mit Isolationslösung im Verhältnis 1 : 100 verdünnt und durch weitere Verdünnung ein Extinktionskoeffizient von 0.32 eingestellt.

b) Eiweißbestimmung (Biuret) nach RICHTERICH (27)

Bei jeder Mitochondrienfraktion wurde jedoch zur endgültigen Kontrolle eine Eiweißbestimmung nach dem Biuret-Verfahren durchgeführt. Der durchschnittliche Eiweißgehalt betrug dabei 12 mg/ml Mitochondriensuspension. Diesem Wert liegen je 4 Parallelbestimmungen zu Grunde.

3. Bestimmung des energiereichen Phosphats (ATP) nach BERGMEYER (5), modifiziert nach SCHNABEL (29)

Die Modifikation besteht darin, daß die relativ hohe Konzentration von 0.4 M TRAP-Puffer gewählt wurde, was eine zusätzliche Neutralisation durch K_2CO_3 und Abzentrifugation des gebildeten $KClO_4$ erspart.

Zur Beendigung der Mitochondrienatmung wird 1 ml Reaktionsmedium in 3 ml 6 %-iger $HClO_4$ einpipettiert. Damit wird das Eiweiß gefällt und die Reaktion augenblicklich gestoppt. Das gefällte Eiweiß wird abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Jede Küvette enthält für die spektralphotometrische Messung folgende Reaktionsmischung:

1. TRAP	0.4 M pH 7.6	2.00 ml
2. $MgCl_2$	0.1 M	0.20 "
3. NADP	5 mg/ml	0.05 "
4. Glucose-6-P-Dehydrogenase	1:10	0.02 "
5. Enteiweißtes Reaktionsmedium		0.05 " (0.10 ")

V = 2.32 ml (2.37 ")

Es wird jedesmal eine Doppelbestimmung mit 0.05 und 0.1 ml enteiweißtem Reaktionsmedium durchgeführt.

Für 2.21 ml Reaktionsmedium gilt:

$$\mu M\ ATP = \frac{\Delta E \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot V_3}{\varepsilon \cdot d \cdot V_4}$$

Dabei bedeuten:

ΔE = Extinktionsdifferenz vor und nach Zugabe von Glucose-6-P-Dehydrogenase

V_1 = Endvolumen in der Küvette (2.32 bzw. 2.37 ml)

V_2 = Verdünnungsfaktor bei Enteiweißung (4)

V_3 = Volumen im Elektrodengefäß (2.21 ml)

V_4 = Volumen der Meßprobe (0.05 bzw. 0.1 ml)

ε = Extinktionskoeffizient bei 366 nm (3.3)

d = Küvettendicke (1)

Zur Bestimmung des Nullwertes wurde statt enteiweißtes Reaktionsmedium die entsprechende Menge enteiweißte Mitochondriensuspension verwendet.
Die Reaktionsgleichungen zum Ablauf der ATP-Messung sind in Teil II A1 aufgeführt.

4. Sauerstoff-Messung mit der 50 μ Pt-Elektrode nach Lübbers

Literatur hierzu siehe bei GLEICHMANN/LÜBBERS (15), LÜBBERS (23), HAGIHARA (16) und DAVIES/BRINK (11). Die Abbildung 13 und 14 zeigen das Prinzip der Elektrode und des Elektrodengefäßes nach GLEICHMANN/LÜBBERS (15), die Abbildung 15 die Elektrode und das Gefäß, die bei der vorliegenden Arbeit benutzt wurden. Die Abänderungen gehen zum Teil auf KESSLER zurück[++], zum

++ Wir danken Priv. Doz. Dr. Kessler für die Überlassung des Elektrodengefäßes

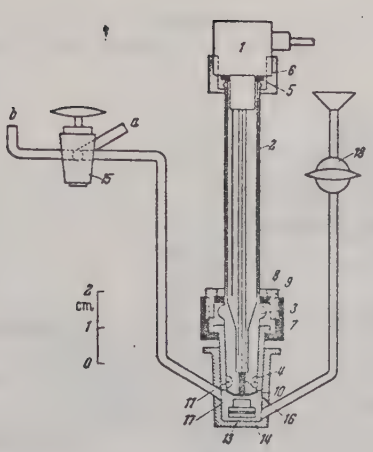


Abbildung 13

pO_2-Elektrode mit Analysengefäß. *1* Pt-Elektr. und Bezugselektrode (als Einsatz), *2* Elektrolengehäuse mit *3* Wulst und *4* Rille (zur Aufnahme des Membran-Befest.-Fadens), *5* Distanzring (Einstellung Pt-Fläche zur Membran), *6* Schraubhalterung (Einsatz-Gehäuse), *7* Schliffhülse, *8* Schraubhalterung (Gehäuse-Schliffhülse), *9* Sprengring, *10* Membran, *11* Befestigungsfaden, *12* Cellophan (Abb.4), *13* Rührstab, *14* Analysengefäß, *15* Mondhahn *a* Anschluß Eichgas, *b* Anschluß Wasserstrahlpumpe, *16* Quecksilber z. Kontaktgabe, *17* Platindraht, *18* Hahn Einfüllseite

(aus GLEICHMANN/LÜBBERS (15))

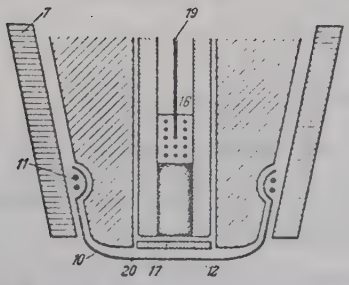


Abbildung 14

Meßkopf der stabilisierten Ganzglas-Platinelektrode. Der Pt-Draht 1,5 mm ⌀ (*17*) ist über das Quecksilber (*16*) mit dem Ableitdraht (*19*) verbunden. Zwischen der blankpolierten Pt-Oberfläche und der Membran (*10*) befindet sich ein 12 μ dickes Cellophanplättchen (*12*). Membranhalterung mit Gummifaden (*11*) und Schliffhülse (*7*). (*20*) Elektrolytspalt mit ges. KCl

(aus GLEICHMANN/LÜBBERS (15))

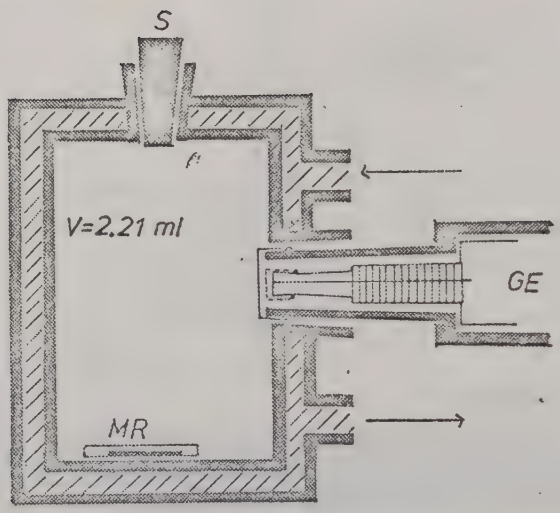


Abbildung 15

Das abgewandelte Elektrodengefäß
S = Schliffstopfen
MR = Magnetrührer
GE = Ganzglaselektrode

Teil wurde das Elektrodengefäß nach unseren Bedürfnissen abgewandelt. So vergrößerten wir das Volumen auf 2.2 ml und schmolzen die Elektrodenzuführung etwa 1 cm über dem Gefäßboden ein, um jeglichen Einfluß des sich drehenden Magnetrührers auf die Elektrode auszuschließen.

a) Das Elektrodengefäß

Das Elektrodengefäß faßt 2.21 ml Reaktionsmedium,das

folgendermaßen zusammengesetzt ist (33) :

Substanz	Menge		Endkonzentration	
Glycylglycin	0.1	ml	0.033	M
KH_2PO_4	0.1	"	0.020	"
KCl	0.1	"	0.017	"
$MgCl_2$	0.1	"	0.050	"
Glucose	1.15	"	0.025	"
Substrat	0.1	"	0.020	"
ADP	0.05	"	0.002	"
Mitochondriensuspension	0.5	"		
Hexokinase	0.01	"		
	2.21	ml	Reaktionsmedium	

Glycylglycin, KH_2PO_4, KCl, $MgCl_2$ und Glucose wurden vor Meßbeginn in entsprechendem Verhältnis in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und mit KOH auf pH 7.4 eingestellt.

Während des Meßvorgangs und während der Eichung muß das Reaktionsmedium kräftig mit dem Magnetrührer durchgerührt werden, um eine konstante Diffusionsschicht vor der Elektrode zu erzeugen.

Nach Zugabe des letzten Reaktionspartners (ADP), wird das Elektrodengefäß mit einem Schliffstopfen verschlossen, um externe Einflüsse auszuschließen.

b) Inbetriebnahme der Elektrode

Bei Inbetriebnahme einer neuen Elektrode oder bei Erneuerung der Bezugselektrode (s. u.), muß ein Polarogramm aufgestellt werden:

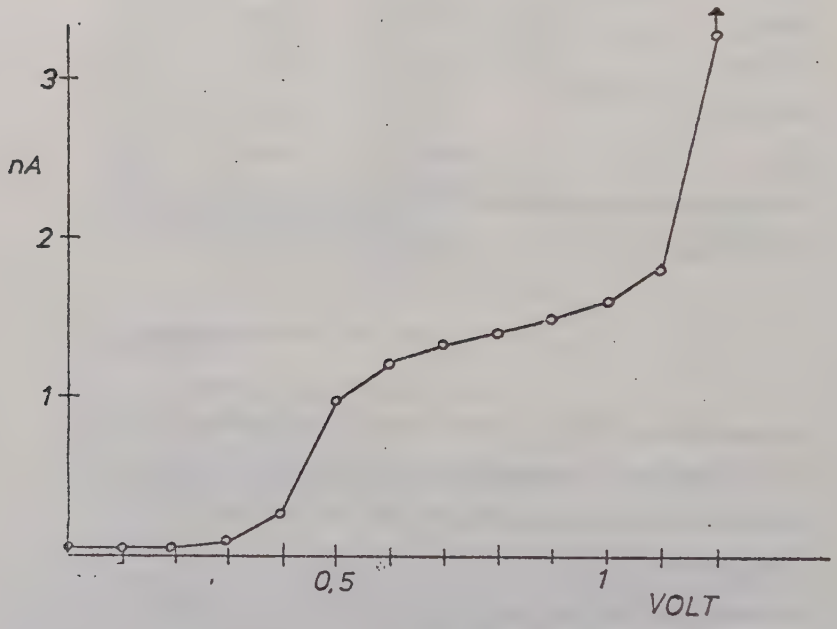


Abbildung 16

Das Polarogramm bei Luftsauerstoffgehalt mit der gut ausgeprägten Stufe von 0.6 bis 1 Volt.
Polarisationsspannung demnach ca. 0.8 Volt, da sich dieser Wert in der Mitte der Stufe befindet

1. Die Elektrode wird wie zu einer Messung vorbereitet (s. u.)

2. Im Elektrodengefäß kann Luft verbleiben oder es wird Wasser eingefüllt (GLEICHMANN/LÜBBERS (15))

3. An die Elektrode werden Spannungen von 0 bis 1.2 Volt gelegt und die entsprechenden Ausschläge am Nanoampèremeter abgelesen

4. Die abgelesenen Werte werden auf Millimeterpapier aufgetragen (Volt - Abszisse und nA - Ordinate) und aus der entstandenen Kurve kann man die Meßspannung ablesen.

c) Herstellen der Bezugselektrode

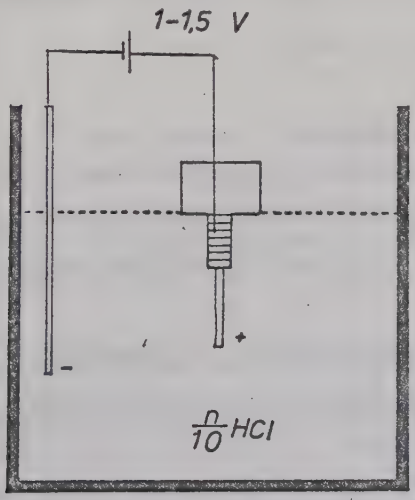


Abbildung 17

Wie oben erwähnt, muß die Bezugselektrode bei Inbetriebnahme einer neuen Elektrode oder bei Verbrauch bzw. Alterung der Ag/AgCl-Schicht neu beschichtet werden.
Die Abbildung 17 zeigt das Prinzip des Vorganges:
Ein Silberdraht wird mit dem Minuspol und die Bezugselektrode mit dem Pluspol einer Batterie (1 - 1.5 V) verbunden und in n/10 HCl getaucht. Die Silberschicht der Bezugselektrode sollte vorher leicht mit feinem Sandpapier aufgerauht werden, um einen besseren Halt der AgCl-Schicht zu gewährleisten. Sogleich nach dem Eintauchen entwickelt sich H_2 und die Bezugselektrode bezieht sich mit einer AgCl-Schicht.
Nach etwa 10 Minuten ist der Vorgang abgeschlossen, und die Elektrode steht zur weiteren Verwendung bereit.

d) Elektrodenvorbereitung

Die Platinspitze wird mit Fe_2O_3 auf einem weichen Holz blankgerieben. Die in 1 M KCl-Lösung angefeuchtete Cellophanmembran wird dann übergezogen und festgebunden.
In die Kunststoffhülse mit der Teflonmembran wird 1 M KCl eingefüllt, die Elektrode luftblasenfrei eingeführt und verschraubt.
Nach Einsetzen der fertigen Elektrode in das Reaktionsgefäß und Auffüllen mit Reaktionsmedium (ohne Mito-

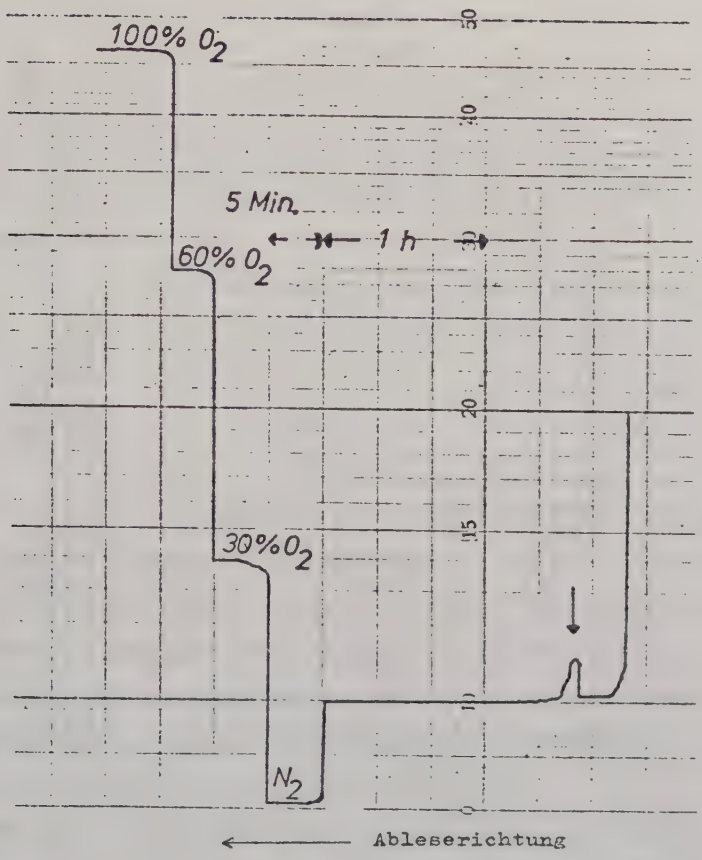


Abbildung 18

Beispiel einer Polarisation mit anschließender Eichung. Der Pfeil zeigt das Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit dem Medium (ohne Mitochondrien, ADP und Hexokinase). Wie zu ersehen, ist die Elektrode längstens nach einer Stunde konstant und kann geeicht werden.

chondriensuspension, ADP und Hexokinase) wird die Meß-spannung angelegt und die Polarisation abgewartet.

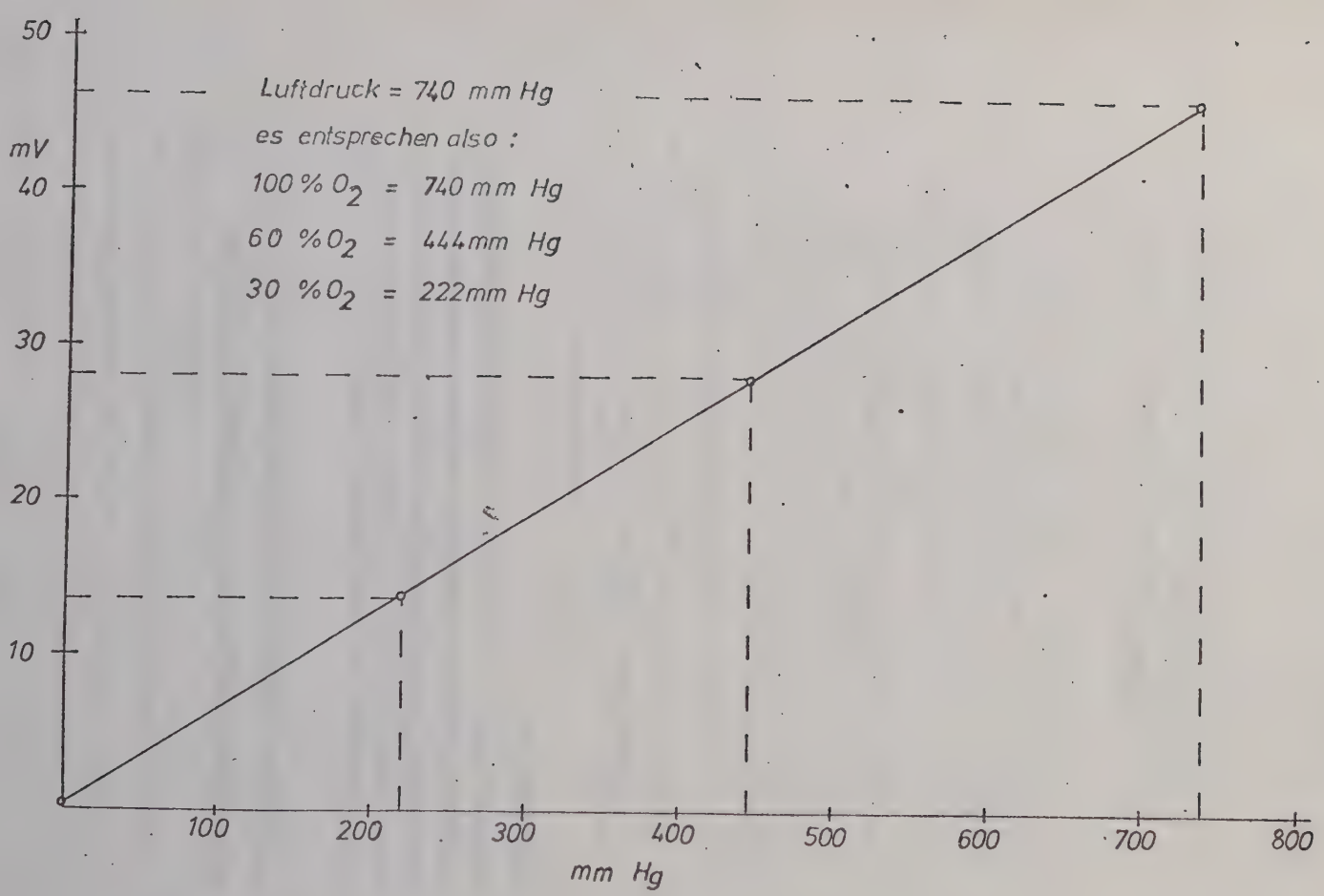


Abbildung 19

Beispiel einer Eichung der 50 µ Platinelektrode

Die Abbildung 19 zeigt eine Eichung der Elektrode, wobei Eichgase folgender Zusammensetzung benutzt wurden:

0	%	Sauerstoff	und	100 %	Stickstoff
30	%	"	"	70 %	Argon
60	%	"	"	40 %	"
100	%	"	"	0	"

Aus den 4 Eichpunkten und dem aktuellen Luftdruck läßt sich die Eichgerade konstruieren.
Die Begasung erfolgte derart, daß die Eichgase mittels einer ausgezogenen Glaskapillare direkt in das Elektrodengefäß geleitet wurden. Man muß durch kräftiges Rühren dafür sorgen, daß sich an der Elektrodenoberfläche keine Sauerstoffblasen ansetzen.
Nach der Eichung wird die Lösung im Elektrodengefäß abgesogen und die Elektrode steht zur Messung bereit.

e) Messung des Sauerstoffverbrauchs

Um die Atmung der Mitochondrien über einen längeren Zeitraum messen zu können und um die Konstanz der Elektrode zu überprüfen, wurde vor jeder neuen Substratzugabe mit 100 % Sauerstoff begast.
Die Abbildung 20 die Sauerstoffverbrauchsmessung der Substrate Succinat, β-Hydroxybutyrat und α-Ketoglutarat bei unbehandelten Rattenlebermitochondrien.

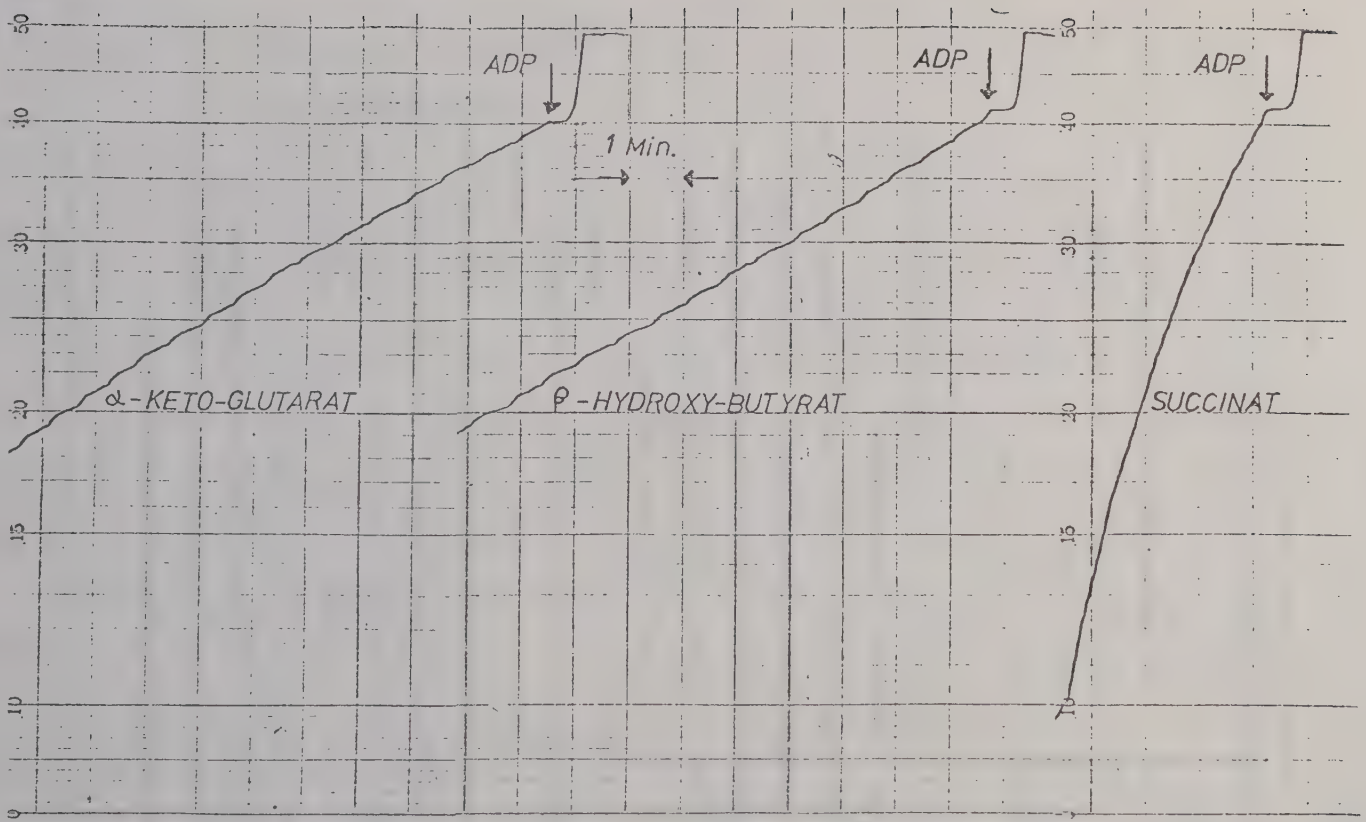


Abbildung 20 ← Ableserichtung

Beispiele der Atmung von Mitochondrien unbestrahlter Ratten. Man beachte besonders den sofortigen Abfall der Kurve nach Zugabe von ADP. Substrate wie angegeben.

Man sieht, daß die Elektrode während der Messung, die insgesamt ca. 30 Minuten dauert, konstant bleibt (hier 49 mV bei voller Sauerstoffsättigung).
Nach Zugabe der Mitochondriensuspension stellt sich auf Grund des Verdünnungseffektes ein neuer Ausgangspunkt ein.
Eine eventuelle Ungenauigkeit der Elektrode nach Zugabe von Mitochondrienprotein ist nach HAGIHARA (16) zu vernachlässigen.
Nach Zugabe von ADP geht die Atmung mit etwa 3 - 5 Sekunden Latenz in den aktiven Zustand über.
Aus technischen Gründen wurde die Atmung mit Succinat mach 4 Minuten unterbrochen.
Bei β-Hydroxybutyrat und α-Ketoglutarat wurde die Atmung nach 10 Minuten gestoppt.
(Die Aufzeichnung der Kurven erfolgte mit einem logarithmischen Kompensationsschreiber, der jedoch aus naheliegenden Gründen im Bereich von 0 bis 10 linear arbeitet. Daher erklärt sich der Knick in der Sauerstoffverbrauchskurve mit Succinat als Substrat bei 10 mV).

F Bestrahlungen

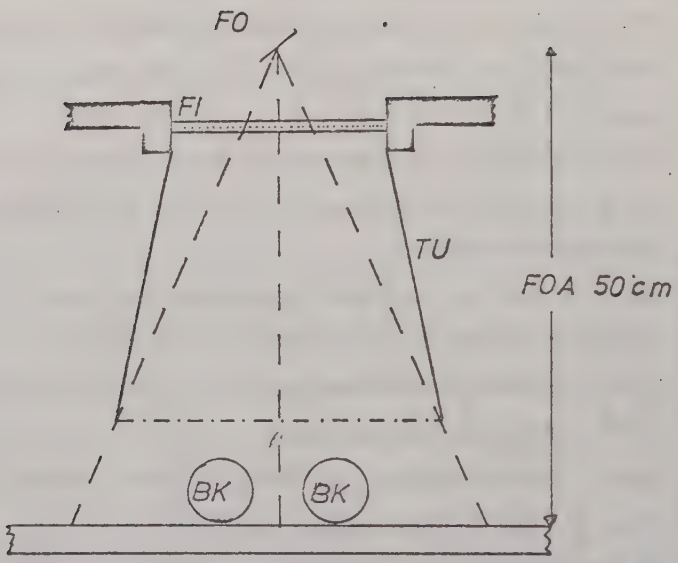


Abbildung 21

Bestrahlungsanordnung, wie sie bei den beschriebenen Versuchen verwendet wurde.

FO = Fokus
FI = Filter
TU = Tubus
BK = Bestrahlungskammern
FOA = Fokus - Oberfächen - Abstand

Zur Bestrahlung diente das Siemens Therapiegerät "Stabilipan".

Bei den gewählten Bestrahlungsbedingungen (Spannung 200 KV, Strom 15 mA, Filter 1 mm Cu) betrug die Dosisleistung in 50 cm Fokus-Oberflächenabstand 44 R/min. Inmitten des Bestrahlungsfeldes (Abbildung 21) wurden die beiden Glaskammern befestigt, in denen die Tiere während der Bestrahlung gehalten wurden.
Die Messkammer wurde jeweils vor und nach der Messung im Phantom mit einem Strontium-Standard-Präparat kalibriert.
Während der Kalibrierung wurde mittels einer Siemens-Sondenfingerhutkammer und eines Universaldosimeters eine Vergleichsdosis im Tubus gemessen. Bei den späteren Versuchen diente die Monitordosis zur Kontrolle der Bestrahlungsbedingungen.+

+
Wir danken Prof. Muth für die Möglichkeit der Durchführung unserer Bestrahlungen im Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes.

VI. Literaturverzeichnis

1. BEKKUM, D.W. van — The Effect of X-Rays on Phosphorylation in vivo. Biochim. Biophys. Acta 25 (1957) 487

2. BEKKUM, D.W. van, JONGEPIER, H.J., NIEUWERKERK, H.T.M., COHEN, J.A. — The Oxidative Phosphorylation by Mitochondria Isolated from the Spleen of Rats after Total Body Expusure to X-Rays. British J. of Radiology 27 (1954) 127

3. BEKKUM, D.W. van — Oxidative Phosphorylation in some Radiosensitive Tissue after Irradiation. Ciba Symposium on Ionizing Radiation and Cell Matabolism London 1960

4. BENJAMIN, L.T. Yost, H.T. Jr. — The Mechanism of Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Rat Spleen and Liver Mitochondria after Whole-Body Irradiation. Radiation Research 12 (1960) 613

5. BERGMEYER — Methoden der enzym. Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962 543

6. BOITEUX, A. — Inauguraldissertation Saarbrücken 1966

7. BUDDECKE, E. — Grundriß der Biochemie
De Gruyter, Berlin 1971

8. CHANCE, B.
WILLIAMS, G.R. — A Simple and Rapid Assay of Oxidative Phosphorylation.
Nature 175 (1955) 1120

9. CHANCE, B.
WILLIAMS, G.R. — Respiratory Enzyms in Oxidative Phosphorylation
I. Kinetics of Oxygen Utilisation.
J. Biol. Chem. 217 (1955) 383

10. DAM, K. van — A possible Explanation for the "Jump" of ATP Observed on Addition of ADP to Mitochondria in State 4.
Preliminary Notes
Biochim.Biophys.Acta 92 (1964) 181

11. DAVIES, PH.W.
BRINK, F. — Microelectrodes for Measuring Local Oxygen Tension in Animal Tissues.
Physical Instruments for the Biologist 13 (1942) 524

12. DEVLIN,TH.M.
BERNICE, H.B. — Effect of Acetoacetat on the Oxidation of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide by Intact Rat Liver Mitochondria.
J.Biol.Chem. 235 (1960) 2135

13. ERRERA, M. — Effets biologiques des radiations Aspects biochimiques. in : Protoplasmatologia - Handbuch der Protoplasmaforschung Band X,3 Herausgegeben von L.V. HEILBRUNN und F. WEBER Springer-Verlag Wien 1957

14. ERRESH, M. FORSSBERG, A. Editors — Mechanisms in Radiobiology Academic Press Nea-York - London 1961

15. GLEICHMANN, U. LÜBBERS, D.W. — Die Messung des Sauerstoffdrucks in Gasen und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut. Pflügers Arch. ges. Physiol 271 (1960) 431

16. HAGIHARA, B. — Techniques for the Application of Polarographie to Mitochondrial Respiration. Biochim.Biophys.Acta 46 (1961) 134

17. HALL, J.C. GOLDSTEIN, A.L. SONNENBLICK, B.P. — Recovery of Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria after Whole-Body Irradiation. J.Biol.Chem. 238 (1963) 1137

18. HENLEY, E.A. NAPIER, E.G. LAUGHREY, E.G. BUDSON, R.D. — Glucose-6-P Formation as a Measurement of Oxidative Phosphorylation in Liver Mitochondria Biochim.Biophys. Acta 69 (1963) 166

19. KADENBACH, B. Der Einfluß von Thyreoidhormonen in vivo auf die oxidative Phosphorylierung und Enzymaktivitäten in Mitochondrien. Biochem.Z. 344 (1966) 53

20. KARLSON, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme Verlag Stuttgart 1967 168

21. KOIVUSALO, M. SLATER, E.C. On the Yield of Respiratory-Chain Phosphorylation Biochem.Z. 342 (1965) 246

22. KOIVUSALO, M. CURRIE, R.D. SLATER, E.C. On the Yield of Respiratory-Chain Phosphorylation. A Postscript Biochem.Z. 344 (1966) 221

23. LÜBBERS, D.W. A Symposium on Oxygen Measurements in Blood and Tissues and their Significance. J.A. Chrchill 1966 103

24. MAXWELL, E. ASHWELL, G. Effect of X-Irradiation on Phosphorus Metabolism in Spleen Mitochondria. Arch.Biochim. 43 (1953) 389

25. NITZ-LITZNOW, D. BÜHRER, G. Die Wirkung von Röntgen-Strahlen in vivo auf die Atmungskettenphosphorylierung und ihre Beeinflussung durch Vitamin K und E. Strahlentherapie 113 (1960) 201

26. OCHOA, S. — Efficiency of Aerobic Phosphorylation in Cell-free Heart Extracts. J.Biol.Chem. 151 (1943) 493

27. Richterich, R. — Klinische Chemie Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt/M. 1965 210

28. SCHACHINGER, L. EISENHARDT, R CHANCE, B. — Stöchiometrischer Zusammenhang zwischen ATP-Bildung und DNPH-Gehalt von Mitochondrien bei Zustandsänderungen der Atmungskette. Biochem.Z. 333 (1960) 182

29. SCHNABEL, K.H. — Persönliche Mitteilung

30. SCHERER, E STENDLER, H.S. Hrsg. — Strahlenpathologie der Zelle Thieme-Verlag 1963

31. SLATER, E.C. — A Method for Measuring the Yield of Oxidative Phosphorylation. Biochem.Z. 53 (1953) 521

32. STREFFER, C. — Strahlen-Biochemie Springer-Verlag - Heidelberger Taschenbücher 59/60 106

33. UMBREIT, W.W. BURRIS, R.H. STAUFFER, J.F. — Manometric Techniques Burgess Publishing Minneapolis 1957 31

34. WEINBACH, E.C. — A Procedure for Isolating Stable Mitochondria from Rat Liver and Kidney Analyt.Biochem. 2 (1961) 335

Frau Professor Dr. WERTH danke ich für die Überlassung des Themas und die Hilfe und Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Desgleichen danke ich Herrn Dr. Schnabel für seine Unterstützung.

Lebenslauf

14.2.1943	geboren als Sohn des Dipl.Ing. Theodor Will und seiner Ehefrau Erika, geb. Naumann in Zwickau/Sa.
1946	Umsiedelung nach Wallhalben/Pfalz
1950	Besuch der dortigen Volksschule
1952	Umzug nach Baden-Baden
1954 - 1963	Besuch des Markgraf-Ludwig-Gymnasiums in Baden-Baden
1963 - 1965	Wehrdienst
Ab Wintersemester 1965 bis 1971	Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
1971	Medizinisches Staatsexamen an der Universität des Saarlandes